

Immunologische und immunhistochemische
Charakterisierung des neuen humanen
 β -Defensins hBD17

Von dem Fachbereich Chemie der Universität Hannover

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation
von
Dipl. Biol. Martin Jübner
geboren am 12.09.1967 in Diepholz

2004

Referent: Prof. Dr. Walter Müller

Korreferent: PD Dr. Erik Maronde

Tag der Promotion: 11.05.2004

Zusammenfassung: Antimikrobielle Peptide sind ein wichtiger Teil der angeborenen Immunität in vielen Tierarten und sie sind an einer Vielzahl von Mechanismen der frühen Immunabwehr beteiligt. Darüber hinaus könnten Vertreter dieser Substanzklasse ein nützliches Werkzeug bei der Bekämpfung antibiotikaresistenter Problemkeime in der Klinik darstellen. Antimikrobielle Peptide sind kleine Peptide mit einer positiven Nettoladung und einem breiten Wirkspektrum gegen Bakterien, Pilze, Viren und Protozoen. Eine sowohl bei Pflanzen und Insekten als auch bei Säugetieren vorkommende Gruppe sind die Defensine. Defensine stellen einen wichtigen Bestandteil der angeborenen Immunabwehr dar und wirken regulatorisch in entzündungsspezifischen Prozessen.

Neben der beschriebenen antimikrobiotischen Aktivität des humanen β -Defensins 17 (hBD17) deuten vorangegangene Expressionsanalysen auf eine mögliche immunmodulatorische oder fertilitätsbeeinflussende Funktion im humanen Nebenhoden hin. Zur Untersuchung dieser putativen Funktionen wurde immunhistologisch eine segmentspezifische und intrazelluläre Lokalisation des Defensins in der *Epididymis* vorgenommen. Zur Charakterisierung des Peptids in bezug auf die Konformation fanden verschiedene immunologische Verfahren (ELISA, Dot Blot, Western Blot) Anwendung, um Rückschlüsse auf die native Peptidform ziehen zu können. Dazu wurden monoklonale Antikörper hergestellt, die in den einzelnen Testmethoden auf ihre Spezifität und Sensitivität gegenüber dem synthetischen hBD17 untersucht wurden. Dabei zeigte sich ein maßgeblicher Einfluß der Konformation und des Redoxzustandes des Moleküls auf die Nachweisgrenzen der Testsysteme. Die Ergebnisse einer *in vitro* Translation gaben keine Hinweise auf die native Konformation des Defensins. Die am besten geeigneten Antikörper wurden zur Detektion und Isolierung von hBD17 in einer Gewebepeptidbank aus 130 ml humanem Ejakulat eingesetzt. Die Verfolgung der immunologischen Aktivitäten führte schließlich zur Aufreinigung von zwei in ihrer Aminosäuresequenz unähnlichen Proteinfragmenten, die vermutlich nicht das Antigen für den spezifischen Antikörper darstellten. In zwei nachfolgend hergestellten Peptidbanken aus den Spermatozoen und der Seminalflüssigkeit aus 280 ml Ejakulat konnten keine reproduzierbaren immunologischen Signale detektiert werden. Eine Aufreinigung von hBD17 aus Gesamtejakulat unter Anwendung der Immunaффinitätschromatographie gelang ebenfalls nicht. Diese Resultate deuten auf eine inflammatorisch induzierte Expression des Peptids hin.

Schlagworte: angeborene Immunität – antimikrobielle Peptide – Defensine

Abstract: Antimicrobial peptides are an important part of the innate immune system in many species. They are involved in a variety of early immune response mechanisms. Moreover, members of this substance class may become a useful tool to counteract the increasing problem of drug-resistant pathogenic bacteria in the clinic. Antimicrobial peptides are structurally diverse, small, positively charged molecules with a broad range of activity against bacteria, fungi, viruses and protozoa. The largest subfamily of antimicrobial peptides - the defensins - is present in plants, insects and mammals. Defensins also act to modulate inflammatory events.

Besides the previously described antimicrobial activity of the human β -defensin 17 (hBD17), recent studies on the expression pattern of this peptide point to a potential regulatory function in immune response and fertility. Immunohistochemistry was performed on sections of human *epididymis* to localize the defensin concerning its segment-specific and intracellular distribution. To obtain hints on the native form of the peptide, different immunologic methods (ELISA, Dot blot, Western blot) were used. For these purposes, monoclonal antibodies (MAb) against hBD17 were generated. These MAbs were examined on their specificity and sensitivity against synthetic hBD17 peptide using the above mentioned methods. Strikingly, the redox state and conformation of the molecule determined the detection limit. The results of an *in vitro* translation revealed no evidence on the native conformation of hBD17. The most useful MAbs were used for the detection and isolation of hBD17 in a peptide library made from 130 ml of human ejaculate. Finally, the tracing of the resulting immunologic signals led to the purification of two protein fragments with a low similarity to each other and to hBD17. Based on this low similarity, these fragments are presumably not the true antigens. In two following generated peptide banks from spermatozoa and seminal fluid out of 280 ml ejaculate no reproducible immunoreactivity could be detected. The purification of hBD17 from untreated sperm by immunoaffinity chromatography failed, too. These results may point to an inflammation-induced expression of hBD17.

Keywords: innate immunity - antimicrobial peptides - defensins

Abkürzungsverzeichnis

μM	Mikromolar
μm	Mikrometer
Å	Angström
ACN	Acetonitril
Bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
cDNA	komplementäre DNA
cpm	<i>counts per minute</i> (Zählimpulse pro Minute)
CRF	Corticotropin Releasing Factor
Da	Dalton
ddH ₂ O	Aqua bidestillata
ddNTP	Didesoxynukleosidtriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EK	Einzelklon
ELISA	<i>enzyme-linked-immunosorbentassay</i>
ESI-MS	Elektrosprayionisation-Massenspektrometrie
ET-1	Endothelin-1
EtOH	Ethanol
et al.	et alii
FCS	Fetales Kälberserum
g	Erdbeschleunigung
h	Stunde
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i> , Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HRP	<i>horseradish-peroxidase</i> , Meerrettich-Peroxidase
IgG	Immunglobulin G
kBp	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
kV	Kilovolt
l	Liter
LB	Luria-Bertani-Vollmedium
LDS	Lithium-Dodecyl-Sulfat
LPS	Lipopolysaccharide
min	Minute/n
M	Molar
MAK	Monoklonaler Antikörper
MALDI-TOF	<i>matrix-assisted laser desorption/ionisation-time of flight</i>
MES	2-(N-morpholino)ethansulfonsäure
MG	Molekulargewicht
ml	Milliliter
mM	Millimolar

N	Normal
n	Versuchsanzahl
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
NMRI Mäuse	Mäuse, die ursprünglich vom Naval Medical Research Institute stammen, Auszuchtstamm
OD	Optische Dichte
ORF	<i>open reading frame</i> (Offenes Leseraster)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> (Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung)
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
PEG	Polyethylenglykol
pM	Picomolar
PVDF	Polyvinylidendifluorid
rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RNA	<i>ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
RP	Reverse Phase
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
s	Sekunden
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TBS	<i>tris buffered saline</i> (Tris-gepufferte Kochsalzlösung)
TCA	Trichloressigsäure
TEQ	<i>tissue equivalent</i> (Gewebeäquivalent)
TFA	Trifluoressigsäure
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Units (definierte Einheiten)
ÜN	Über Nacht
UTR	Untranslatierte Region
V	Volt
VE	Voll entsalzt
w/v	<i>weight per volume</i> (Gewicht pro Volumen)

Zur Abkürzung von Aminosäuren und Nukleotiden wurde die Ein- bzw. Dreibuchstaben-Nomenklatur verwendet.

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	4
1 EINLEITUNG.....	9
1.1 DAS CHEMISCHE ABWEHRSYSTEM.....	10
1.2 HUMANE ANTIMIKROBIELLE PEPTIDE.....	12
1.3 PHYSIOLOGISCHE FUNKTIONEN ANTIMIKROBIELLER PEPTIDE.....	17
1.4 DIE INNEREN MÄNNLICHEN GESCHLECHTSORGANE.....	19
1.5 ANATOMIE DES NEBENHODENS.....	20
1.6 FUNKTION DES NEBENHODENS	21
1.7 ZIEL DER ARBEIT	22
2 MATERIAL UND METHODEN.....	23
2.1 CHEMISCHE SYNTHESE VON β -DEFENSINEN.....	23
2.2 HERSTELLUNG MONOKLONALER ANTIKÖRPER	23
2.2.1 <i>Präparation des Antigens</i>	23
2.2.2 <i>Immunisierung von Mäusen</i>	24
2.2.3 <i>Fusion von B-Lymphoblasten und Myelomzellen</i>	24
2.2.4 <i>Auswahl der Klone (ELISA)</i>	26
2.3 CHARAKTERISIERUNG UND AUFREINIGUNG DER MONOKLONALEN ANTIKÖRPER	26
2.4 PROTEINBESTIMMUNG	28
2.5 HERSTELLUNG VON PEPTIDBANKEN AUS HUMANEM EJAKULAT	28
2.5.1 <i>Beschaffung des Materials</i>	28
2.5.2 <i>Trennung von Spermatozoen und Seminalflüssigkeit</i>	29
2.5.3 <i>Präparation der Rohextrakte</i>	29
2.5.4 <i>Präparative Chromatographie zur Herstellung der Peptidbanken</i>	30
2.5.4.1 <i>pH-Stufenelution</i>	30
2.5.4.2 <i>Präparative Reverse Phase (RP) Chromatographie</i>	31
2.6 SCREENING DER PEPTIDBANKEN	32
2.6.1 <i>Probenvorbereitung</i>	32
2.6.2 <i>Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)</i>	33
2.6.3 <i>Immunoblot-Analyse (Western Blot)</i>	34
2.7 ISOLIERUNG IMMUNOLOGISCH DETEKTIERTER PEPTIDE.....	36
2.7.1 <i>Reverse Phase HPLC</i>	36
2.7.2 <i>Kationen-Austausch-HPLC</i>	37
2.8 ANALYTISCHE UNTERSUCHUNGEN DER IMMUNREAKTIVEN PROTEINE.....	38
2.8.1 <i>'Matrix-assisted laser desorption/ionisation-time of flight' (MALDI-TOF)</i>	38
2.8.2 <i>Kapillarzonenlektrophorese</i>	38
2.8.3 <i>Sequenzierung der Peptide</i>	39

2.9	IMMUNHISTOCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN	39
2.9.1	<i>Gewebepräparation</i>	39
2.9.2	<i>Präparation der eingebetteten Schnitte</i>	40
2.10	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	41
2.10.1	<i>Klonierung und Sequenzierung von DNA-Fragmenten</i>	41
2.10.1.1	Verwendete Oligonukleotide	41
2.10.1.2	Sterilisation von Lösungen und Materialien	41
2.10.1.3	Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	42
2.10.1.4	Standard-Polymerasekettenreaktion (PCR)	42
2.10.1.5	Kolonie-PCR	44
2.10.1.6	Gelelektrophoretische Trennung von DNA	45
2.10.1.7	Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen	46
2.10.1.8	Ligation	46
2.10.1.9	Herstellung transformationskompetenter Zellen	47
2.10.1.10	Transformation von Plasmid-DNA in kompetente <i>E. coli</i> -Zellen	47
2.10.1.11	Mini-Präparation von Plasmid-DNA	48
2.10.1.12	Sequenzierung von DNA	49
2.10.1.13	Aufreinigung von Sequenzierproben durch DNA-Präzipitation	50
2.10.2	<i>In vitro Translation von hBD17</i>	50
2.10.2.1	Bildung eines transkriptions- und translationsaktiven Komplexes	50
2.10.2.2	Visualisierung der <i>in vitro</i> translatierten Produkte	51
2.10.2.3	Bestimmung der prozentualen Aufnahme der markierten Aminosäure	51
2.10.3	<i>Genutzte Datenbanken und Software</i>	52
3	ERGEBNISSE	53
3.1	<i>IN VITRO</i> TRANSKRIPTION/TRANSLATION	53
3.1.1	<i>Amplifizierung der für hBD17 kodierenden cDNA</i>	53
3.1.2	<i>In vitro Translation eines Kontrollpeptids</i>	55
3.1.3	<i>Entfernung des die Expression vermutlich behindernden Startcodons</i>	56
3.1.4	<i>Visualisierung der Resultate</i>	60
3.2	IMMUNHISTOCHEMISCHER NACHWEIS VON HBD17	62
3.2.1	<i>Untersuchungen zur Sensitivität und Spezifität der generierten monoklonalen Antikörper mit immunologischen Methoden</i>	62
3.2.2	<i>Verteilung von hBD17 in humanem Nebenhoden</i>	65

3.3	VERFOLGUNG DER IMMUNOLOGISCHEN SIGNALE IN DEN HUMANEN SPERMA-PEPTIDBANKEN	69
3.3.1	Primärscreening.....	70
3.3.2	Aufreinigungsschritt 1: Reverse Phase Rechromatographie.....	71
3.3.3	Aufreinigungsschritt 2a: Reverse Phase Chromatographie	72
3.3.4	Aufreinigungsschritt 2b: Kationen-Austausch-Chromatographie.....	73
3.3.5	Aufreinigungsschritt 3: Zweite Reverse Phase Rechromatographie.....	74
3.4	HERSTELLUNG VON PEPTIDBANKEN AUS HUMANEM EJAKULAT	76
3.5	ALTERNATIVE AUFREINIGUNGSSTRATEGIEN.....	80
4	DISKUSSION	82
4.1	hBD17 WIRD IN EPITHELZELLEN DES <i>CAPUT EPIDIDYMIDIS</i> EXPRIERT	82
4.2	DIE <i>IN VITRO</i> TRANSLATION VON hBD17 IST VON MEHREREN FAKTOREN ABHÄNGIG	85
4.3	EINE DENATURIERUNG DES ANTIGENS BEEINFLUßTE DIE NACHWEISGRENZE DER EINZELNEN IMMUNOLOGISCHEN ANALYSEMETHODEN	88
4.4	DER REDOX-ZUSTAND VON hBD17 IST ENTSCHEIDEND FÜR DIE DETEKTION IN DER WESTERN BLOT- ANALYSE	90
4.5	AUFREINIGUNG VON IMMUNREAKTIVEN PEPTIDEN AUS DER HUMANEN EJAKULAT-PEPTIDBANK	92
4.6	REPRODUZIERBARKEIT DER IMMUNOLOGISCHEN SIGNALE IN DEN SPÄTER HERGESTELLTEN SPERMA- PEPTIDBANKEN.....	94
4.7	IN UNBEHANDELTEM EJAKULAT KONNTEN IMMUNOLOGISCHE SIGNALE DETEKTIERT WERDEN.....	96
4.8	AUSBLICK.....	98
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	99
6	LITERATURVERZEICHNIS.....	100
7	ANHANG	111

1 Einleitung

Pathogene Organismen, wie Bakterien, Viren, Pilze und andere Mikroben, versuchen ständig, in den menschlichen Körper einzudringen. Zur Erhaltung der Körperfunktionen und zur Abwehr von Erkrankungen müssen täglich Millionen dieser Organismen abgewehrt werden. Der menschliche Körper verteidigt sich gegen Mikroorganismen mit Hilfe des Immunsystems, wobei die erste Verteidigungslinie die Haut bildet. Bereiche, die nicht von Haut bedeckt sind, wie die Augen, der Mundbereich, die Lungen, der Urogenital- und Verdauungstrakt und alle weiteren Körperöffnungen sind einem Angriff von pathogenen Keimen und Mikroorganismen in besonderem Maße zugänglich. In den epithelialen Strukturen dieser Areale sind besondere Abwehrsysteme realisiert, die u.a. antimikrobielle Wirkstoffe in die Sekrete der entsprechenden Schleimhäute, die Tränenflüssigkeit und den Speichel abgeben.

Im Verlauf der Chordaten-Evolution haben sich zwei kooperierende Abwehrsysteme entwickelt: die angeborene, nicht adaptive Abwehr und das spezifische Immunsystem. Während das erste in unterschiedlicher Ausprägung bei allen Tieren vorkommt, haben nur die Wirbeltiere ein spezifisches Immunsystem entwickelt. Beim Menschen wird ebenfalls zwischen dem angeborenen und dem erworbenen, spezifischen Immunsystem unterschieden. Die Komponenten des angeborenen Immunsystems sind von Geburt an vorhanden und voll funktionsfähig. Innerhalb des angeborenen Systems wird eine Abgrenzung zwischen der zellulären Immunantwort und der Immunantwort durch lösliche Botenstoffe (humorale Immunantwort) vorgenommen. Die maßgeblichen Bestandteile des angeborenen zellulären Immunsystems sind die "Fresszellen" (Granulozyten, Monozyten und Makrophagen), deren Hauptfunktion in der Phagozytose von Krankheitserregern besteht. Den Hauptbestandteil der humoralen Immunantwort bildet das Komplementsystem, welches durch Antikörper oder Bakterienbestandteile aktiviert wird. Dieses Komplementsystem hat verschiedene Funktionen, wie die chemische Anlockung und Aktivierung von Leukozyten, aber auch die direkte Bekämpfung von pathogenen Keimen. Weitere Träger der unspezifischen angeborenen Immunabwehr sind mechanische und chemische Schranken auf Haut und Schleimhäuten und antimikrobielle Proteine, wie Defensine und verschiedene proteolytische Enzyme (chemische Abwehr).

Auch der erworbene Anteil des Immunsystems wird von Zellen und Botenstoffen geprägt. Diese Bestandteile sind ebenfalls von Geburt an vorhanden, müssen jedoch erst noch ausreifen. Zum Zeitpunkt der Geburt des Individuums ist noch kein sogenanntes "immunologisches Gedächtnis"

ausgebildet. Aufgrund der aus dem immunologischen Gedächtnis resultierenden Immunität erkrankt ein Individuum im Normalfall nur einmal an einem bestimmten Erreger. Kommt es zu einem zweiten Kontakt mit diesem Erreger, wird dieser dann durch die Gedächtnisfunktion erkannt und inaktiviert. Diese Funktion entwickelt sich beim Menschen in den ersten Lebensjahren.

Der zelluläre Anteil des erworbenen Immunsystems besteht aus spezialisierten Leukozyten, den T-Zellen und B-Zellen. Eine Funktion der T-Zellen ist das Abtöten von Krankheitserregern, welche dann von Fresszellen phagozytiert werden. Fast noch wesentlicher ist der Einfluß der T-Zellen auf die Orientierung anderer Zellen des Immunsystems (z.B. Fresszellen, B-Zellen). Die B-Lymphozyten sind der Ort der Antikörpersynthese. Antikörper sind Eiweiße, die Mikroben erkennen und diese den unterschiedlichen Zellen des Immunsystems präsentieren können. Jede Krankheit, die der Entwicklung oder der Funktion von B-Zellen schadet, verursacht eine Verminderung der Antikörper. Im humanen Blut kommen fünf Arten von Antikörpern (Immunglobuline) vor: IgG, IgA, IgM, IgD, IgE. Das Immunglobulin IgG ist der im Blut am stärksten konzentrierte Antikörper, gefolgt von IgM und IgA. Die Antikörper IgD und IgE sind nur in geringen Mengen im Blut vorhanden und nur marginal an der Verteidigung gegen Infektionen beteiligt. Das IgG wird in vier Untergruppen klassifiziert (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4); jede Untergruppe nimmt unterschiedliche Funktionen bei der Erregerabwehr wahr. Alle Teile des Immunsystems beeinflussen sich wechselseitig stark untereinander. Eine Fehlfunktion in einem Bestandteil des Immunsystems zieht häufig Störungen in der Immunantwort einer anderen Komponente nach sich.

1.1 Das chemische Abwehrsystem

Wirbeltiere besitzen ein hocheffizientes System zur Abwehr von Infektionen, das auf dem Zusammenspiel mehrerer spezialisierter Effektorzellen beruht. Dazu gehören z.B. neutrophile Granulozyten (Abwehr von Bakterien und Pilzen), eosinophile Granulozyten (Abwehr von Parasiten), natürliche Killerzellen (Erkennung virusinfizierter Zellen), Makrophagen und Antikörper produzierende Zellen sowie T-Lymphozyten. Botenstoffe (z.B. Chemokine) veranlassen die normalerweise im Blut zirkulierenden neutrophilen Granulozyten und Phagozyten, in entzündete Epithelien zu wandern. Diese Effektorzellen befinden sich also während nicht-inflammatorischer Phasen nicht in epithelialen Strukturen und können daher für die natürliche Resistenz der Epithelien gegen ständig drohende bakterielle Infektionen primär nicht verantwortlich sein.

Der erste Nachweis einer antimikrobiellen Aktivität in humanen Geweben gelang ALEXANDER FLEMING bereits 1922 im menschlichen Nasensekret. Dieser Wirkstoff wurde später als Lysozym identifiziert, ein Protein, das die Zellwand von Bakterien zerstören kann. Zahlreiche Studien der letzten Jahre belegen die Bedeutung eines chemischen Abwehrsystems für den Erhalt der Integrität der Epithelien. Es zeigte sich insbesondere, daß antimikrobiell wirksamen Proteinen sowohl Funktionen als endogene Antibiotika wie auch als vermittelnde Substanzen in der angeborenen und erworbenen Immunität (Abbildung 1) zukommen könnten (BALS *et al.*, 2001).

Das Immunsystem der Evertebraten, denen im Gegensatz zu den Wirbeltieren ein effektives System adaptiver Komponenten zur Abwehr von Mikroorganismen fehlt, verdeutlicht die Schlüsselrolle der antimikrobiotischen Proteine in der angeborenen Immunabwehr. Wirbellose verfügen nicht über die bereits erwähnten Effektorzellen (z.B. Makrophagen, neutrophile und eosinophile Granulozyten) sowie T-Lymphozyten und Antikörper produzierende B-Zellen. Sie besitzen jedoch ein effizientes chemisches Abwehrsystem, welches unter anderem auf der Synthese antimikrobiell wirksamer Proteine basiert. Die epitheliale Expression dieser verschiedenen, antimikrobiell wirksamen Moleküle fungiert somit als eine Art „chemischer Schutzschild“ des Organismus gegen mikrobielle Infektionen. In den Epithelien von Vertebraten wird ebenfalls eine Vielfalt von antimikrobiellen Proteinen gebildet (HARDER *et al.*, 2001). In diesem Zusammenhang beobachteten ZASLOFF und Mitarbeiter, daß die nach einer Entnahme von Oozyten nur notdürftig und unsteril versorgten Wunden bei Fröschen, die in ihr natürliches Habitat zurückgesetzt wurden, keine nennenswerten Infektionen nach sich zogen. Der Autor folgerte daraus, daß die Schleimhaut der Frösche antimikrobielle Proteine produzieren könnte. Aus den Schleimdrüsen der Frösche gelang ZASLOFF 1987 schließlich die Isolierung antimikrobiell wirksamer Peptide, die er als Magainine bezeichnete. Nachfolgend wurde eine Vielzahl an antimikrobiellen Proteinen, z.B. Brevinine- und Melittine, aus der Schleimhaut von Fröschen isoliert (SIMMACO *et al.*, 1994). Diese Proteine besitzen die Fähigkeit, gram-negative und gram-positive Bakterien sowie Pilze bereits in geringen Konzentrationen äußerst effektiv abzutöten. Im Zusammenhang mit Untersuchungen an Epithelien der Luftröhre von Rindern konnten DIAMOND *et al.* (1991) mit dem „trachealen antimikrobiellen Peptid“ (TAP) das erste induzierbare antimikrobielle Peptid in Säugetieren isolieren. Dieses Molekül weist die für β -Defensine typische intramolekulare Struktur in Form von sechs durch Disulfidbrücken verbundenen Cysteinen auf. In humanen Geweben wurden ebenfalls zahlreiche Proteine nachgewiesen, die dem Schutz von Epithelien gegen den Angriff von Mikroorganismen dienen, so z.B. Peptide aus den Gruppen der Defensine, Cathelizidine, Thrombozidine und Histatine (PESCHEL, 2002).

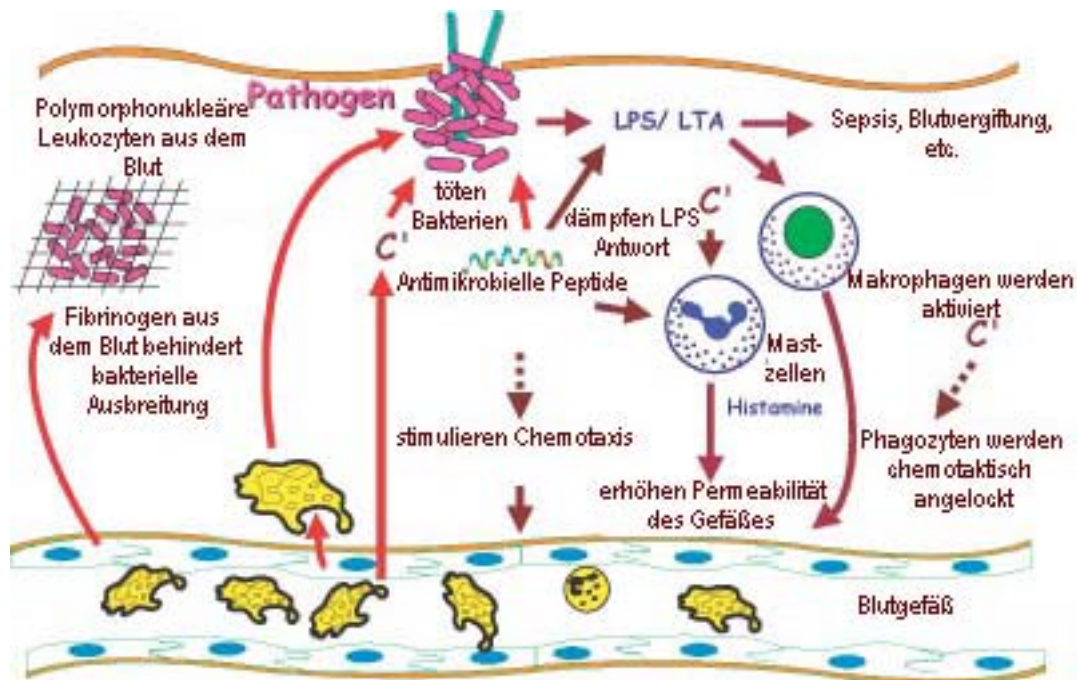


Abbildung 1: Übersicht über die Funktionen antimikrobieller Peptide im Immunsystem des Menschen.

1.2 Humane antimikrobielle Peptide

Als antimikrobielle Peptide werden Peptidmoleküle bezeichnet, die antimikrobiell aktiv, weniger als 100 Aminosäuren lang und von individuellen Genen kodiert sind. Kationische Peptide mit antimikrobieller Funktion wurden in allen Lebensformen, vom Bakterium bis hin zum Menschen, gefunden und stellen daher vermutlich einen der konserviertesten Mechanismen der Evolution dar, um den eigenen Organismus gegen aggressive Eindringlinge zu schützen (BALS, 2000). Bisher konnten über 800 verschiedene Vertreter dieser Substanzklasse in Eukaryoten identifiziert werden (TOSSI, 2003). Die antimikrobiellen Peptide spielen auch eine wichtige Rolle in der angeborenen Immunität von Säugetieren. Ihr antimikrobiotisches Spektrum ist weit und umfaßt gram-negative und gram-positive Bakterien, Pilze, Protozoen und lipidumhüllte Viren. Daher gelten diese Moleküle als potentielle Wirkstoffe u.a. bei der Behandlung von viralen (CHERNYSH *et al.*, 2002) und parasitären Infektionen (VIZIOLI *et al.*, 2001). Basierend auf ihrer Struktur können antimikrobielle Peptide in verschiedene Familien eingeteilt werden. Bei Säugetieren sind Peptide mit einer durch Cysteinbrücken stabilisierten β -Faltblattstruktur am weitesten verbreitet, aber auch andere Familien kommen vor (Tabelle 1). Die Peptide werden in verschiedenen Zelltypen gebildet, insbesondere in Abwehrzellen, wie Makrophagen oder Neutrophilen, sowie in Epithelzellen. In den menschlichen Atemwegen werden α - und β -Defensine und Cathelizidine von respiratorischen Epithelien synthetisiert und an die Epitheloberfläche abgegeben (BALS, 2000). Im Tiermodell und in klinischen Untersuchungen wurde belegt, daß ein Fehlen von Cathelizidinen und Defensinen zu Erkrankungen führen kann

(GALLO und NIZET, 2003). Das erste isolierte humane β -Defensin hBD1 und sein murines Homolog mBD1 werden in den Speicheldrüsen, in den Atemwegen und im Urogenitaltrakt exprimiert (VALORE *et al.*, 1998; BALS *et al.*, 1998), was auf eine Funktion in der Immunabwehr der Schleimhaut hindeutet (LI *et al.*, 2001). Von einigen antimikrobiellen Peptiden wird darüber hinaus angenommen, daß sie eine wichtige Rolle in der Immobilisierung von Spermien und damit in der männlichen Fertilität spielen (D'CRUZ *et al.*, 1995).

Die Gruppen der antimikrobiellen Peptide variieren stark in Länge, Aminosäuresequenz und Sekundärstruktur. Trotz dieser erstaunlichen Vielfältigkeit bezüglich der molekularen Strukturen und der chemischen Eigenschaften ist allen diesen Molekülen die antimikrobiotische Wirksamkeit gemein. Dieser Umstand führte zur Einschätzung der humanen antimikrobiellen Peptide ("natürliche Antibiotika") als neue und innovative Alternative zu klassischen Antibiotika. Die antimikrobiellen Peptide bieten darüber hinaus vielversprechende Einsatzmöglichkeiten als biotechnologische Werkzeuge (MARSHALL und ARENAS, 2003). Die meisten dieser Peptide besitzen wegen des überwiegenden Gehalts an kationischen Aminosäuren (Arginin und Lysin) im Vergleich zu anionischen Aminosäuren (Asparaginsäure und Glutaminsäure) bei neutralem pH eine positive Nettoladung und weisen in ihrer dreidimensionalen Struktur eine hydrophobe und eine hydrophile Seite auf (amphipathische Struktur). Diese Struktureigenschaften sind wesentlich für eine Interaktion mit der Bakterienmembran und damit für den Wirkungsmechanismus. Alle Vertreter dieser Substanzklasse werden als Präpropeptid ribosomal synthetisiert (KAISER und DIAMOND, 2000), wobei die Struktur des Signalpeptids entscheidend für die lysosomale Speicherung bzw. die Sekretion der Peptide in das umliegende Gewebe und in die Blutbahn ist (STRYER, 1994). Die häufig anionische Prosequenz neutralisiert vermutlich das kationische, reife Peptid und blockiert so eine mögliche zytotoxische Wirkung (KAISER und DIAMOND, 2000). Die für die Freisetzung der bioaktiven Peptide verantwortlichen Enzyme sind noch weitgehend unbekannt (SØRENSEN *et al.*, 2001).

Eine besonders weit verbreitete Gruppe antimikrobiell aktiver Peptide bilden die Defensine, die sowohl in Pflanzen, Insekten und Wirbeltieren, als auch beim Menschen nachgewiesen wurden. Defensine sind kleine Moleküle, die sechs konservierte Cysteinreste enthalten (FELLERMANN und STANGE, 2001). Nach der relativen Position und der wahrscheinlichen Verknüpfung der Cysteine werden α - und β -Defensine unterschieden (Abbildung 2). TRAN *et al.* (2002) beschreiben mit den in Rhesusaffen entdeckten, sogenannten θ -Defensinen eine dritte Defensinfamilie, die sich ebenfalls durch drei intramolekulare Disulfidbrücken und eine homodimere Struktur aus zwei α -Defensin-ähnlichen Peptiden auszeichnet.

Tabelle 1: Einige charakteristische antimikrobielle Peptide von Säugetieren. Die Angabe der Aminosäuresequenz entspricht der Einbuchstaben-Nomenklatur, die tiefgestellten Ziffern geben die Disulfidverbrückung der Cysteine an.

Peptid	Struktur	Aminosäuresequenz
HNP-1 (α -Defensin)	β -Faltblatt	AC ₁ YC ₂ RIPAC ₃ IAGERRYGTC ₃ IYQGRLWAFC ₂ C ₁
HBD-2 (β -Defensin)	β -Faltblatt	MRVLYLLFSFLFIFLMPLPGVFGGIGDPVTC ₁ LKSGAIC ₂ HPVFC ₃ PRR YKQIGTC ₂ GLPGTKC ₁ C ₃ KKP
LL-37 (Cathelizidin)	α -helikal	LLGDDFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLPVPTES
Cecropin P1	α -helikal	SWLSKTAKKLENSAKKRISGIAIAIQGGPR
Bactenizin	Schleife	RLC ₁ RIVVIRVC ₁ R
Indolizidin	Gestreckt	ILPWKWPWWPWRR-NH
Bac5	Gestreckt	RFRPPIRRPPIRPPFYPPFRPPIRPPIFPPIRPPFRPPLGPFP

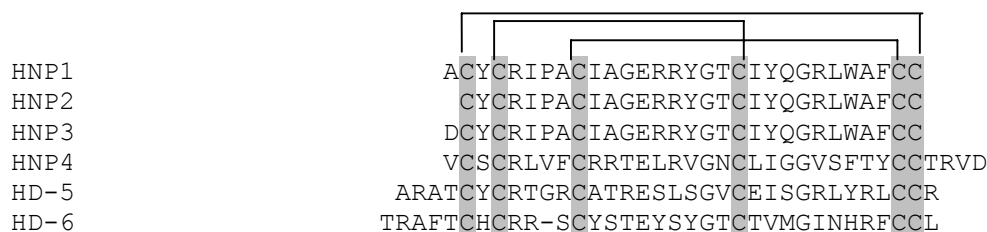
α -Defensine wurden in neutrophilen Granulozyten und Makrophagen vieler Säugetiere (LILLARD *et al.*, 1999) und in den Paneth-Körnerzellen von Mensch, Maus und Ratte gefunden (KAISER und DIAMOND, 2000). Beim Menschen wurden bisher sechs α -Defensine identifiziert, HNP-1 bis HNP-4, sowie HD5 und HD6 (LEHRER und GANZ, 2002a). Neben ihrer antimikrobiotischen Wirkung wurde für diese Peptide auch eine chemotaktische Aktivität gegenüber Monozyten und Leukozyten (CHERTOV *et al.*, 1996) und für HNP-1, HNP-2 und HNP-3 ein Einfluß auf die Wundheilung (ZHOU *et al.*, 2003) postuliert. In diesem Zusammenhang beschreiben ZHOU *et al.* (2003) auch eine erhöhte Konzentration der α -Defensine 1-3 in humaner Tränenflüssigkeit nach Augenoperationen, was auf eine induzierte Expression der genannten Peptide hindeutet. Dieser Umstand steht im Widerspruch zu den Erkenntnissen von VAN WETERING und Mitarbeitern aus dem Jahr 1999, die für α -Defensine eine konstitutive Expression vermuten.

Aus der Familie der humanen β -Defensine wurden bis dato sechs Vertreter ausführlich beschrieben. Das erste native humane β -Defensin (hBD1) konnten BENSCH *et al.* (1995) aus Hämofiltrat isolieren. In den folgenden Jahren wurden hBD2 (HARDER *et al.*, 1997) und hBD3 (HARDER *et al.*, 2001) aus abgeschilferten Hautschuppen aufgereinigt. Im Verlauf neuerer Studien wurden die für hBD4, hBD5 und hBD6 kodierenden Gene *DEFB4* (GARCIA *et al.*, 2001b), *DEFB5* und *DEFB6* (YAMAGUCHI *et al.*, 2002) beschrieben. Das vorwiegend in Niere und Uterus gebildete hBD1 (VALORE *et al.*, 1998) weist nur eine relativ geringe antimikrobielle Wirkung auf und wird, im Gegensatz zu den anderen genannten humanen β -Defensinen, vermutlich konstitutiv exprimiert. Für diese Annahme spricht die Detektion von hBD1 in der bronchoalveolären Lavage (BAL) gesunder Patienten, während hBD2 nur aus der BAL von Patienten mit entzündlichen Lungenerkrankungen isoliert werden konnte (SINGH *et al.*, 1999).

Untersuchungen neueren Datums deuten jedoch auf eine teilweise Regulierung der Expression von hBD1 durch proinflammatorische Zytokine oder noch nicht identifizierte Faktoren hin (LEHMANN *et al.*, 2002).

Der detaillierte Mechanismus der antimikrobiotischen Wirkung der Defensine ist noch nicht vollständig geklärt. Ihre mikrobizide Aktivität beruht auf der Porenbildung in der anionischen Lipid-Doppelschicht und dem daraus resultierenden Zusammenbruch des Membranpotentials der Mikroorganismen. Durch die folgende Lyse der Zellen werden die Erreger abgetötet (BALS, 2000). Ein Einfluß von hBD2 (YANG *et al.*, 1999) und hBD3 (GARCÍA *et al.*, 2001) auf die Chemotaxis von T-Zellen und Monozyten deutet darauf hin, daß diese Peptide neben der Abwehr pathogener Keime noch weitere Funktionen in der humanen Immunantwort wahrnehmen könnten. In der Regel zeigen Defensine synergistische Aktivitäten mit anderen immunologisch wirksamen Molekülen, wie Lysozym oder Lactoferrin (BALS, 2000). Aufgrund ihrer Multifunktionalität stellt diese Peptidfamilie vermutlich ein Bindeglied zwischen der erworbenen und der angeborenen Immunität dar (FELLERMANN und STANGE, 2001).

α -Defensine



β -Defensine

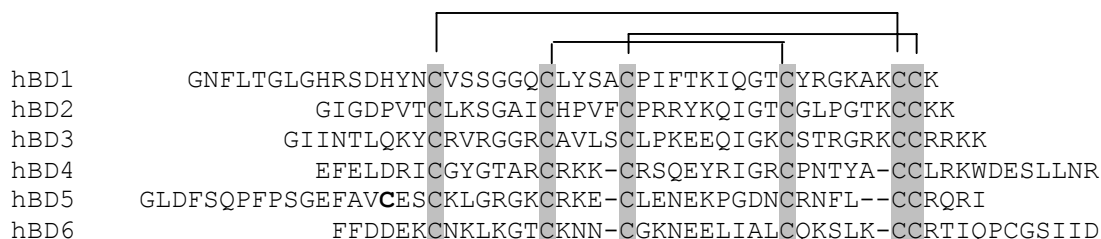


Abbildung 2: Aminosäuresequenzen der beschriebenen α - und β -Defensine. Die konservierten Cysteinreste sind grau unterlegt. Die angenommene Verbrückung der α -Defensine (1-6, 2-4, 3-5) und β -Defensine (1-5, 2-4, 3-6) ist durch die schwarzen Linien dargestellt.

Eine weitere wichtige Gruppe innerhalb der antimikrobiellen Peptide sind die Cathelizidine, eine Familie von antimikrobiellen Vorläuferproteinen (LEHRER und GANZ, 2002b), die speziessübergreifend in myeloiden Zellen von Säugern gefunden wurden (ZANETTI *et al.*, 1995). Diese Vorläuferproteine werden in neutrophilen Leukozyten gespeichert. Sie zeichnen sich durch

einen hochkonservierten N-terminalen Propeptidanteil und eine sehr variable C-terminale Domäne aus, die ihre antimikrobielle Aktivität nach Abspaltung des Propeptidanteils entfaltet (SKERLAVAJ *et al.*, 1996). Die Cathelizidine nehmen eine "Wächterrolle" als multifunktionale Elemente der angeborenen Immunabwehr ein (NIZET und GALLO, 2003). Ihre Funktion beschränkt sich nicht auf das Abtöten von Mikroorganismen, sondern sie richten die Immunantwort durch die Rekrutierung von Leukozyten auf den Ort der Infektion, regulieren die epitheliale Expression von Chemokinen und deren Rezeptoren hoch (SCOTT *et al.*, 2002) und binden und neutralisieren bakterielle Lipopolysaccharide (SAWA *et al.*, 1998). Beim Menschen wurde mit dem von LARRICK *et al.* 1995 beschriebenen hCAP-18 (*human 18-kDa cationic antimicrobial protein*) bisher erst ein Mitglied aus der Familie der Cathelizidine gefunden. Die Sequenz des antimikrobiell wirksamen, reifen Peptids ist 37 Aminosäuren lang und beginnt mit zwei Leucinresten. Daher wurde dieses Peptid als LL-37 bezeichnet (GUDMUNDSSON *et al.*, 1996). LL-37 konnte in relativ großen Mengen aus neutrophilen Granulozyten isoliert werden und ist induzierbar (FROHM *et al.*, 1997). Dieses Molekül blockiert bakterielles Lipopolysaccharid in nanomolaren Konzentrationen (ZAREMBER *et al.*, 2002) und stimuliert in höheren Konzentrationen ($>\mu\text{g/ml}$) die Angiogenese *in vivo* und *in vitro* (KOCZULLA *et al.*, 2003).

Die dritte im Menschen beschriebene Familie antimikrobieller Peptide bilden die Histatine, Histidin reiche antimikrobielle Peptide, die im Speichel repräsentiert sind (OPPENHEIM *et al.*, 1988). Die abundantesten Histatine 1 und 3 bestehen aus 38 bzw. 32 Aminosäureresten, kleinere Vertreter dieser Gruppe sind vermutlich posttranslationale Modifizierungsprodukte dieser Moleküle (BALS, 2000). Sie sind vor allem fungizid wirksam (OPPENHEIM *et al.*, 1988).

KIRCHHOFF *et al.* (1990) identifizierten sechs für den humanen Nebenhoden spezifische cDNAs (HE1-HE6), deren Genprodukte β -Defensin-ähnliche Peptide darstellen, die in keinem anderen Gewebe exprimiert werden. Einige dieser sogenannten humanen Spermatozoen-Antigene interagieren mit der Spermatozoenoberfläche und sind möglicherweise an der Verschmelzung der Gameten beteiligt (OSTERHOFF *et al.*, 1994). Im Rahmen des Humanen Genom Projektes konnte das für HE2 kodierende Gen auf dem kurzen Arm des Chromosoms 8 in direkter Nachbarschaft zu den Genen *DEFB3* und *DEFB4* lokalisiert werden. Drei der identifizierten Spleißvarianten des Genprodukts (HE2C, HE2D und HE2E) weisen die gleiche Cysteinverteilung wie die Familie der β -Defensine auf und besitzen ebenfalls eine bakterizide Wirkung (VON HORSTEN *et al.*, 2002). Diese kleinen kationischen Peptide werden in das epididymale Lumen sekretiert und binden spezifisch an die Oberfläche der Spermatozoen (HAMIL *et al.*, 2000). Der Nebenhoden ist ständig der Gefahr einer Infektion durch

Mikroorganismen ausgesetzt (LI *et al.*, 2001), da er anatomisch in direkter Verbindung zur Harnröhre steht (Abbildung 4). Die epididymale Expression der humanen β -Defensine hBD4, hBD5 und hBD6 läßt somit auf eine Funktion der genannten Moleküle beim Schutz der Spermatozoen gegen den Angriff pathogener Erreger schließen (YAMAGUCHI *et al.*, 2002).

1.3 Physiologische Funktionen antimikrobieller Peptide

Eine Vielzahl von Indizien weist darauf hin, daß antimikrobielle Peptide für die immunologische Abwehr des menschlichen Organismus eine wichtige Rolle spielen, wenn konkrete Beweise auch noch ausstehen (BALS, 2000). Da das Abwehrsystem des Menschen ein äußerst komplexes Gefüge zahlreicher Faktoren ist, deren einzelne Funktionen experimentell nur schwer erfaßt werden können, sind die Zusammenhänge zwischen der Dysfunktion antimikrobieller Peptide und auftretenden Krankheiten weit von der vollständigen Aufklärung entfernt. Dennoch wird die Bedeutung dieser Moleküle für den Organismus durch den Mangel oder die Überexpression verschiedener antimikrobieller Peptide in verschiedenen pathophysiologischen Zuständen deutlich. So kommt es bei Entzündungen der Haut, des Zahnfleisches und des Kolons zu einer erhöhten Expression von hBD2, und auch die α -Defensine HD-5 und HD-6 werden bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen und bei Divertikulitis vermehrt gebildet (FELLERMANN und STANGE, 2001). Dagegen weisen viele HIV-Patienten verringerte Histatinkonzentrationen im Speichel auf, was sie anfälliger für eine orale Candidose macht (FITZGERALD *et al.*, 2003). Eine ungenügende Sekretion von hBD1 im respiratorischen Trakt äußert sich vermutlich in einer erhöhten Infektionsanfälligkeit der Lunge bei zystischer Fibrose (BALS *et al.*, 1998).

Wie bereits erwähnt deuten einige Forschungsergebnisse darauf hin, daß antimikrobielle Peptide einen Einfluß auf die Reifung und die Funktionalität von Spermatozoen haben. Beispielsweise ist hCAP-18, das Vorläuferprotein des humanen Cathelizidins LL-37, in relativ großen Mengen im Ejakulat enthalten, wo es in der Kopfregion der Spermatozoen lokalisiert werden kann (MALM *et al.*, 2000). Darüber hinaus wurden sowohl beim Menschen als auch in Ratten und verschiedenen Affenarten epididymisspezifisch exprimierte Nukleinsäuresequenzen isoliert, die alle für das konservierte Cysteinmuster der β -Defensine kodieren (PERRY *et al.*, 1999; FRÖHLICH *et al.*, 2001; LI *et al.*, 2001). Das humane HE2 β ₁ und das bei Ratten gefundene Peptid Bin1b zeigen eine solche Übereinstimmung des Cysteinmusters, und beide Sequenzen werden im Kopf des Nebenhodens (*Caput epididymidis*) exprimiert. Dies spricht für eine weitere physiologische Funktion antimikrobieller Peptide, denn Spermatozoen werden erst durch den Kontakt mit einer

Vielzahl von epididymal synthetisierten Proteinen während der Nebenhodenpassage befruchtungsfähig (FRÖHLICH *et al.*, 2001).

Kationische antimikrobielle Peptide zeigen oftmals eine hohe Affinität für Lipopolysaccharide (LPS), die den Hauptbestandteil der äußeren Membran gram-negativer Bakterien bilden. Solche Peptide töten die Bakterien durch das vollständige Ersetzen der membranstabilisierenden, divalenten Kationen ab (HANCOCK und CAPPLE, 1999). Die LPS-Bindungsfähigkeit mancher antimikrobieller Peptide bietet einen großen Vorteil im Vergleich zu den klassischen Antibiotika, da dieser Wirkmechanismus eine Hochregulierung proinflammatorischer Zytokine verhindert und deshalb die Gefahr einer Blutvergiftung oder gar einer Sepsis nicht erhöht (GOUGH *et al.*, 1996). Weiterhin ist für α -Defensine eine mitogene Wirkung bei der Zellproliferation in der Niere, für Magainine und einige α -Defensine eine selektive Lyse von Tumorzellen und für HNP-1, HNP-2 und HNP-3 eine Funktion in der Signaltransduktion durch eine starke inhibitorische Wirkung auf die Proteinkinase A beschrieben (KAMYSZ *et al.*, 2003). Die schon angesprochene Verbindung zwischen angeborener und erworbener Immunität äußert sich vor allem durch die chemotaktischen Aktivitäten der antimikrobiellen Peptide. So verstärken Defensine und das porcine Peptid PR-39 die unspezifische Immunantwort durch das Anlocken von phagozytierenden Monozyten und neutrophilen Granulozyten (TERRITO *et al.*, 1989; CHAN und GALLO, 1998), und Defensine offenbaren eine Chemotaxis nicht nur gegenüber unspezifischen Phagozyten, sondern auch gegenüber Zellen, die Bestandteil der adaptiven Immunabwehr sind (KAMYSZ *et al.*, 2003). Eine Übersicht der konzentrationsabhängigen biologischen Aktivitäten von Defensinen ist in Abbildung 3 dargestellt.

Derzeit werden die meisten klinischen Studien mit antimikrobiellen Peptiden für topische Anwendungen durchgeführt, da die Zytotoxizität vieler dieser Substanzen einen Einsatz für systemische Anwendungen erschwert bzw. verbietet (HANCOCK, 2000; PACOR *et al.*, 2002). Einige Substanzen werden aber auch für inhalative oder gastrointestinale Applikationsrouten entwickelt. Diese topischen Anwendungen erlauben allerdings keinen Schluß auf die Verwendbarkeit antimikrobieller Peptide für den Einsatz als systemische Antibiotika (BALS, 2000). Aufgrund ihres breiten Wirkungsspektrums ist in der Zukunft die Verwendung antimikrobieller Peptide nicht nur als Antibiotika, sondern auch als Immunmodulatoren sowie anti-LPS-Pharmaka denkbar (BALS, 2000). Auch ein Einsatz antimikrobieller Peptide in niedriger Konzentration in Verbindung mit der Gabe herkömmlicher Antibiotika könnte sinnvoll sein, besonders im Hinblick auf synergistische Effekte (PACOR *et al.*, 2002).

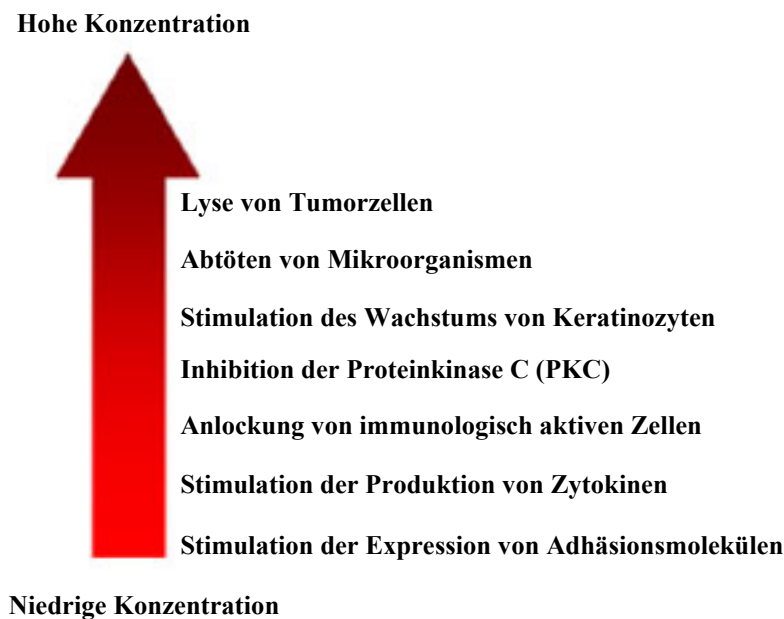


Abbildung 3: Das Spektrum der biologischen Aktivität von Defensinen (nach KAMYSZ *et al.*, 2003).

1.4 Die inneren männlichen Geschlechtsorgane

Zu den inneren männlichen Geschlechtsorganen gehören Hoden (*Testis*), Nebenhoden (*Epididymis*) und Samenleiter (*Ductus deferens*), die Harnröhre (*Urethra*) und die akzessorischen Geschlechtsdrüsen. Bis auf die *Urethra*, die *Prostata*, die Samenblasendrüse und die Harnröhrenzwiebeldrüse sind sie paarig angelegt. In der Embryonalentwicklung bilden sich die Hoden aus der Genitalleiste, in welche die Urkeimzellen über das dorsale *Mesenterium* einwandern. Die *Ductuli efferentes* gehen aus nicht zurückgebildeten Urnierenkanälchen hervor. Der Nebenhodenkanal entsteht aus dem kranialen Teil des Urnierenganges, während sich Samenleiter, Samenleiterampulle und Samenblase aus dem distalen Teil bilden.

Der Hodensack (*Skrotum*) wird durch eine bindegewebige Scheidewand geteilt. In beiden Skrotalfächern liegt ein Hoden mit dem Nebenhoden und dem sich anschließenden Teil des Samenleiters. Sie werden dabei von mehreren sogenannten Hodenhüllen umgeben. Die Anlage von Hoden und Nebenhoden befindet sich in der Embryonalphase an der hinteren Wand der Leibeshöhle. Beide Organe wandern während der weiteren Entwicklung nach kaudal und erreichen in den letzten Monaten der Schwangerschaft über den Leistenkanal ihre endgültige Position im bereits vorgebildeten Hodensack. Dieser Vorgang der Hodenverlagerung wird als *Descensus testis* bezeichnet. Der Hoden ist die männliche Keimdrüse. In diesem Organ werden

u.a. Geschlechtshormone (Androgene) und Samenzellen (Spermatozoen) gebildet. Der Nebenhoden liegt dem hinteren Rand des Hodens an. Sein ausführender Gang (*Ductus epididymidis*) geht kontinuierlich in den Samenleiter (*Ductus deferens*) über. Dieser bildet zusammen mit seinen Hüllen, den begleitenden Blut- und Lymphgefäßen sowie Nerven den Samenstrang (*Funiculus spermaticus*). Durch den Samenleiter werden die Spermien während der Ejakulation abgeleitet. Er verläuft durch den Leistenkanal in das kleine Becken bis zur Hinterfläche der Vorsteherdrüse (*Prostata*), durchbohrt diese und mündet in den oberen Abschnitt der Harnröhre ein. Im letzten Abschnitt des Samenleiters münden die Ausführungsgänge der Samenbläschen (*Vesiculae seminales*). In Abbildung 4 ist der Weg der Spermatozoen durch die männlichen Geschlechtsorgane dargestellt.

1.5 Anatomie des Nebenhodens

Der Nebenhoden wird grobmorphologisch in drei anatomische Segmente unterteilt; in den bulbusförmigen Kopf (*Caput epididymidis*), den langgestreckten Körper (*Corpus epididymidis*) und den wiederum bulbusartigen Schwanz (*Cauda epididymidis*). Der Nebenhoden liegt dem Hoden dorsolateral in Längsrichtung auf und ist durch ein Gekröse (*Mesepididymis*) eng mit ihm verbunden bzw. an einigen Stellen mit ihm verwachsen. Eine weitere Verbindung besteht in dem *Ligamentum testis proprium*, das vom Nebenhodenschwanz zur Kaudalfläche des Hodens führt. Mit dem *Ligamentum caudae epididymidis* ist der Nebenhoden in dem Scheidenhautfortsatz (*Processus vaginalis*), der den Hodensack auskleidet, verankert. Über die Anzahl der aus dem *Rete testis* austretenden *Ductuli efferentes* existieren in der Literatur widersprüchliche Angaben, sie variieren von 6-12 Kanälen (ILIO und HESS, 1994). Diese Kanäle vereinigen sich im *Caput epididymidis* zum Nebenhodenkanal (*Ductus epididymidis*). Dieser verläuft in zahlreichen, eng gewundenen Schlingen, welche durch Bindegewebe miteinander verbunden sind. Seine Länge beträgt 5-6 m; er bildet den Großteil des Nebenhodens. Der Samenleiter stellt die Fortsetzung des *Ductus epididymidis* dar, der medial des Hodengekröses Richtung Bauchhöhle verläuft und schließlich in den Beckenabschnitt der Harnröhre mündet. Das Epithel der *Ductuli efferentes* ist einschichtig kubisch bis mehrreihig hochprismatisch, mit Kinozilien besetzt und bildet eine auffallend gezackte, unregelmäßige Begrenzung des Lumens. Im Gegensatz dazu ist das Epithel des *Ductus epididymidis* zweireihig hochprismatisch und mit Stereozilien ausgestattet. Es erscheint als glatte Begrenzung des Lumens des Nebenhodenganges. Nach distal weist das Lumen einen zunehmend großen Durchmesser auf, während die Epithelhöhe abnimmt. Intraepithelial treten Lymphozyten und Makrophagen auf. Das Epithel des Nebenhodenganges wird von glatter Muskulatur umgeben, die nach distal dicker wird und durch spontane,

rhythmisch-peristaltische Kontraktionen den Nebenhodeninhalt transportiert. Es ist durch stereozilienbesetzte, hochprismatische Hauptzellen und rundliche Basalzellen charakterisiert. Die Hauptzellen gehen vermutlich aus den Basalzellen hervor und haben sowohl resorptive als auch sekretorische Funktionen. So sekretieren sie eine Vielzahl von Proteinen, die Einfluß auf die Reifung der Spermien haben und resorbieren funktionsuntüchtige Spermatozoen (KING, 2002).

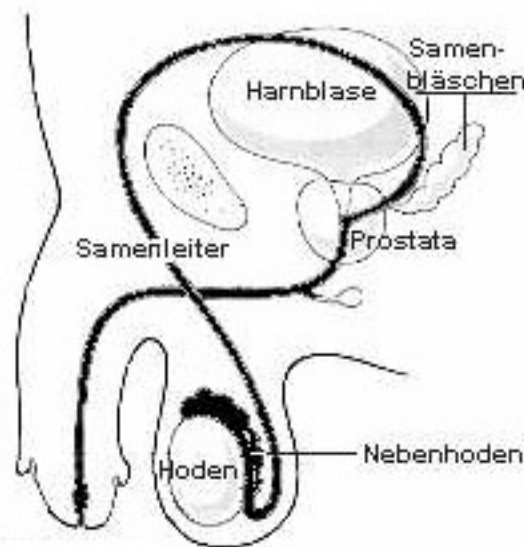


Abbildung 4: Der humane männliche Geschlechtsapparat. Durch die dunkle Färbung ist der Weg der Spermatozoen durch den Urogenitaltrakt angedeutet.

1.6 Funktion des Nebenhodens

Der Nebenhoden spielt im Fortpflanzungsprozeß des Menschen eine wichtige Rolle, denn er dient nicht nur als Speicherorgan für die Spermien, sondern ist auch wesentlich an deren Reifung beteiligt. Spermatozoen sind nach Verlassen des Hodens noch nicht befruchtungsfähig. Erst durch die im Nebenhodenkanal stattfindenden Prozesse erhalten die Spermien die Fähigkeit zur gerichteten Vorwärtsbewegung, zum Überleben im weiblichen Reproduktionstrakt, zur Akrosomenreaktion, zur Bindung an die *Zona pelucida* und zur Fusion mit der Vitellinmembran der Eizelle. Die Spermatozoen wandern aus den Samenkanälchen der Hoden durch das *Rete testis* und die *Ductuli efferentes* in den Nebenhoden und schließlich in den Samenleiter (*Vas deferens*).

In der proximalen Kopffregion des Nebenhodens sind die Spermatozoen unidirektional orientiert und oftmals parallel zueinander angeordnet, was darauf hindeutet, daß die Spermatozoen in diesem Entwicklungsstadium noch keine eigene Motilität aufweisen und ausschließlich mit der Seminalflüssigkeit transportiert werden. Im Verlauf der weiteren Passage erlangen die Spermatozoen im *Corpus epididymidis* eine Eigenmotilität, sie sind in diesem Stadium jedoch

nur zu kreisenden Bewegungen fähig und zeigen noch keine gerichtete Vorwärtsbewegung (ABOU-HAILA und TULSIANI, 2000). Die Fähigkeit zur gerichteten Vorwärtsbewegung erhalten die Spermatozoen in der *Cauda epididymidis* im Rahmen der Ausdifferenzierung zu vollständig funktionsfähigen Zellen (YANAGIMACHI, 1994).

Der Nebenhoden besteht aus einer Anordnung von stark gewundenen Arealen des *Ductus epididymidis*, die durch Bindegewebe getrennt sind. Diese Areale sind charakterisiert durch die Morphologie ihrer epithelialen Zellen und das Spektrum der jeweiligen exprimierten Faktoren, welche die Maturation, den Transport und die Speicherung der Spermatozoen beeinflussen (YEUNG *et al.*, 1993; HAMILTON, 1990). Die molekularen Grundlagen dieser Faktoren sind noch weitgehend ungeklärt, offensichtlich spielen die lokalen Unterschiede im Expressionsmuster entlang des *Ductus epididymidis* jedoch eine wesentliche Rolle in der Physiologie des Nebenhodens und damit auch in der posttestikulären Reifung der Spermatozoen. Die räumliche Unterteilung des Nebenhodens in morphologisch und funktionell unterschiedliche Teile könnte wesentlich für den Reifungsprozeß der Spermatozoen und deren Speicherung sein, denn die Reihenfolge, in der die Spermatozoen mit den sekretierten Produkten der epididymalen Epithelien in Kontakt treten, hat vermutlich einen entscheidenden Einfluß auf die resultierenden physiologischen Vorgänge (CORNWALL und HANN, 1995). Die Notwendigkeit der Nebenhodenpassage für die Maturation und damit für die Fertilisationsfähigkeit der Spermien wird jedoch durch aktuelle Versuchsergebnisse in Frage gestellt, denn es konnten erfolgreiche Fertilisationen mit testikulären Spermatozoen durchgeführt werden (LEGARE *et al.*, 2001).

1.7 Ziel der Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Dissertation bestand in der Charakterisierung des humanen β -Defensins hBD17 (nach neuer Nomenklatur DEFB-23, *Swiss-Prot Primary accession number* Q8N688) in bezug auf immunmodulatorische und gewebespezifische Expression sowie auf mögliche Konformationszustände des Moleküls und deren Einfluß auf eine Antikörperbindung. Weiterhin war eine Isolierung bzw. *in vitro* Translation der nativen Form des Peptids beabsichtigt, um aus der Aufklärung der nativen Struktur Rückschlüsse auf die biologische Funktion des Defensins ziehen zu können. Zu diesem Zweck sollte eine Vielzahl von monoklonalen Antikörpern gegen hBD17 hergestellt und in verschiedenen immunologischen Verfahren getestet werden. Eine Auswahl der am besten geeigneten Antikörper sollte zur immunhistochemischen Detektion, zur Aufreinigung aus Gewebepeptidbanken und zur strukturellen Charakterisierung des Moleküls verwendet werden.

2 Material und Methoden

2.1 Chemische Synthese von β -Defensinen

Alle im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten synthetischen Peptide der β -Defensinfamilie wurden in der Abteilung für Peptidsynthese der IPF PharmaCeuticals GmbH synthetisiert. Die Herstellung von linearem hBD17 erfolgte nach dem Prinzip der Festphasenpeptidsynthese (MERRIFIELD, 1986) unter Verwendung der Fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc)-Schutzgruppenchemie auf einem automatischen Peptidsynthesizer 433A (ABI). Die Synthese wurde auf 0,1 mmol eines vorbeladenen TentaGel S Trt Harzes (Rapp Polymere) durchgeführt. Die Fmoc-geschützten Aminosäuren wurden der Reaktion für die Kopplung im zehnfachen Überschuß hinzugefügt und durch HBTU (2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorophosphat) aktiviert. Fmoc-Cystein war Trityl-geschützt. Nach Abschluß der Synthese wurde lineares hBD17 (1-37) mit einer frisch angesetzten Mischung von Trifluoressigsäure, Ethandithiol und Wasser (94:3:3) drei Stunden vom Harz abgespalten und durch Zugabe von kaltem tert-Butylmethylether präzipitiert. Das Rohpeptid wurde lyophilisiert und anschließend in Wasser aufgenommen und filtriert. Die Aufreinigung des synthetisierten Peptides erfolgte über eine präparative HPLC (Vydac C18, The Separations Group). Das durch ESI-MS (API 100, ABI) ermittelte Molekulargewicht von hBD17 (1-37) entsprach dem theoretisch berechneten Molekulargewicht von 4523,4 Da.

2.2 Herstellung monoklonaler Antikörper

Peptide mit einem geringen Molekulargewicht sind in der Regel nicht immunogen. Um die immunogene Aktivität des synthetischen Peptids zu steigern, wurde eine Polymerisierung mit dem Trägermolekül Hämocyanin durchgeführt. Die Herstellung der Antikörper erfolgte zusammen mit Frau Dr. Heitland in der Abteilung Funktionsanalyse der IPF PharmaCeuticals GmbH.

2.2.1 Präparation des Antigens

Zur N-terminalen Kopplung des Antigens wurde 1 mg synthetisches hBD17 in 200 μ l ddH₂O gelöst. Das Peptid wurde in Anwesenheit von Carbodiimid [1 mg/150 μ l ddH₂O] mit Hämocyanin aus *Megathura crenulata* [11,4 mg/400 μ l ddH₂O] konjugiert. Dazu wurde der

Reaktionsansatz 24 Stunden bei 4 °C inkubiert. Der Abbruch der Reaktion erfolgte durch die Zugabe von 200 µl Hydroxylamin [13,8 mg/200 µl ddH₂O] (GOODFRIEND *et al.*, 1964; CARRAWAY und KOSHLAND, 1968).

Die C-terminale Kopplung des Antigens (1 mg gelöst in 500 µl ddH₂O) erfolgte mit 30 mg Hämocyanin und dem Einsatz von 500 µl Glutaraldehyd [20 mM] in PBS (pH 7,2). Die Inkubation fand unter den oben beschriebenen Bedingungen statt. Überschüssiges Peptid und Glutaraldehyd wurden vom Konjugat durch Dialyse gegen 50 mM PBS abgetrennt. Beide Konjugationsansätze wurden auf 1 ml mit ddH₂O aufgefüllt [1 mg/ml] und bei -20 °C gelagert.

2.2.2 Immunisierung von Mäusen

Weibliche Mäuse im Alter von 6 bis 8 Wochen (Stamm NZW x NZB) wurden mit dem - wie oben beschrieben - gekoppelten Antigen über einen Zeitraum von 17 Tagen immunisiert. Am Tag 0 der Immunisierung erhielten die Mäuse jeweils 6 µg des Antigens in einem Gesamtvolumen von 30 µl subkutan in die Hinterbeine und 20 µg Antigen in einem Volumen von 20 µl peritoneal injiziert. Das gekoppelte Antigen wurde dazu in Gerbu-Adjuvant MM (Gerbu Biotechnik GmbH, Gaiberg; Produkt-Nummer # 3100) emulgiert. Die erste "Booster"-Injektion erfolgte mit 6 µg Antigen in 10 µl Gerbu-Adjuvant MM subkutan in die Hinterbeine und 10 µg Antigen in 20 µl intraperitoneal am Tag 3 des Immunisierungszeitraumes. Bei den nachfolgenden Injektionen an den Tagen 6, 10, 13 und 16 wurde das gekoppelte Antigen nur noch subkutan in die Hinterbeine appliziert (6 µg, gelöst in 30 µl PBS). Am Tag 17 wurden die Tiere getötet und entblutet. Direkt anschließend erfolgte die Entnahme der poplitealen Lymphknoten und der Milz. Das Serum wurde gewonnen und bei -20 °C gelagert. Es diente später in der ELISA-Analyse der monoklonalen Antikörper als Positivkontrolle.

2.2.3 Fusion von B-Lymphoblasten und Myelomzellen

Voraussetzung für eine erfolgreiche Fusion und Klonierung von Hybridoma-Zellen ist das Vorhandensein von Makrophagen, sogenannten "feeder cells", in der Zellkultur. Die Makrophagen wurden ein bis drei Tage vor der Fusion aus NMRI-Mäusen gewonnen. Dazu wurden die Bauchhöhlen von sechs Mäusen mit kaltem PBS gespült und die Zellen anschließend abzentrifugiert. Die aus einer Maus geernteten Makrophagen wurden auf fünf 24-Loch-Zellkulturschalen mit OPTIMEM-Medium, das 5 % FCS und Hypoxanthin/Azaserin (zur Wachstumshemmung sich schnell teilender Zellen) enthielt, verteilt.

Am Tag der Fusion erfolgte die sterile Entnahme der poplitealen Lymphknoten und der Milz der

immunisierten Mäuse. Diese wurden in eine Petri-Schale mit DMEM-HEPES-Medium [25 mM HEPES] überführt. Anschließend wurden die Lymphknoten und Milzen zwischen den Enden zweier steriler Objektträger zerkleinert. Die so erhaltenen Zellsuspensionen wurden in serumfreiem HEPES-Medium gewaschen und danach 5 Minuten bei 200 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und verworfen. Myelomzellen der Linie X63-Ag8.653 (KEARNEY *et al.*, 1979) wurden in serumfreiem HEPES-Medium gewaschen und in zwei 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Die Ansätze wurden ebenfalls 5 Minuten bei 200 x g zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Im Anschluß wurden die Niederschläge in HEPES-Medium resuspendiert, vorsichtig gemischt (Milzzellen mit Myelomzellen 1:2, Lymphknotenzellen mit Myelomzellen 1:2) und erneut unter den gleichen Bedingungen zentrifugiert. Der Überstand wurde wiederum abgesaugt und verworfen. Anschließend wurden 1,5 ml auf 37 °C vorgewärmtes Polyethylenglykol (PEG) unter leichtem Schütteln innerhalb einer Minute auf das Sediment gegeben. Das PEG wurde durch tropfenweises Zugabe von DMEM-HEPES-Medium verdünnt, bis ein Endvolumen von 20 ml erreicht war. Es folgte eine fünfminütige Inkubation der Röhrchen in einem 37 °C warmen Wasserbad. Danach wurden die Zellen vorsichtig zentrifugiert, der Überstand verworfen und der Niederschlag in 20 ml HAT-Selektionsmedium (OPTIMEM-Medium mit Hypoxanthin, Aminopterin und Thymidin (HAT) und 5 % FCS) resuspendiert. Von den fusionierten Zellen aus der Milz wurden 75 % bei -80 °C eingefroren. Der Rest der Zellen wurde mit einer statistischen Häufigkeit von 5, 1 und 0,5 Zellen pro Kavität auf eine 96-Loch-Zellkulturschale verteilt. Die aus den Lymphknoten gewonnenen Hybridoma-Zellen wurden entsprechend in eine 96-Loch-Zellkulturschale ausplattiert. Nach 5 Tagen wurde ein Tropfen HAT-Selektionsmedium in jede Vertiefung gegeben. Nach 10 bis 14 Tagen Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂ konnten die Hybridoma-Kolonien getestet werden (YELTON und SCHARFF, 1980).

Nach der abgeschlossenen Selektion der überlebensfähigen Zellen (ca. 3 Wochen) wurden die Hybridoma-Zellen mit HT-Medium (ohne Aminopterin) versorgt. Zur Sicherstellung der Monoklonalität der Zellklone wurden die Hybridoma-Zellen zweimal rekloniert. Dazu wurden die Zellklone nach dem gleichen Verfahren wie bei der ursprünglichen Klonierung auf 96-Loch-Zellkulturschalen vereinzelt (s.o.). Nach erfolgreicher Klonierung konnten die Klone schrittweise auf größere Kulturflächen umgesetzt werden (24-Loch-Schalen, 12-Loch-Schalen, 6-Loch-Schalen, Kulturflaschen). Der anfallende antikörperhaltige Zellkulturüberstand wurde gesammelt und für die Charakterisierung der MAK verwendet.

2.2.4 Auswahl der Klone (ELISA)

Die Zellkulturüberstände der Hybridoma-Klone, in denen sich die Antikörper angereichert hatten, wurden im Festphasen-Enzymimmunosorbentassay (ELISA) getestet. Dazu wurden die Kavitäten von Mikrotiter-Platten (Maxisorp) mit jeweils 200 ng Antigen in Karbonat/Bikarbonat-Puffer (pH 9,6) über Nacht bei 4 °C beschichtet. Alle anschließenden Inkubationen erfolgten bei Raumtemperatur auf einem Rotationsschüttler (IKA Labortechnik, Modell KS 250 basic) bei 300 Umdrehungen pro Minute. Unspezifische Bindungsstellen wurden mit 1x Roti-Block (Fa. Roth) abgesättigt. Es folgte ein zweimaliger Waschschrift mit PBS/0,05 % Tween 20. Die Kavitäten der Mikrotiter-Platten wurden dann mit 100 µl Hybridoma-Zellkulturüberstand bzw. Serum-Verdünnungen befüllt und für 1 bis 2 Stunden inkubiert. Nach drei weiteren Waschschriften mit PBS/0,05 % Tween 20 wurden 100 µl einer 1:40.000 Verdünnung eines an Meerrettich-Peroxidase (HRP) gekoppelten Kaninchen Anti-Maus IgG (Fab spezifisch, Fa. Sigma) in jede Kavität gegeben und für 1 Stunde inkubiert. Anschließend wurde erneut viermal mit PBS/0,05 % Tween 20 gewaschen. Durch den Zusatz von TMB-Substrat (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine) wurde die kolorimetrische Reaktion initiiert. Das Abstoppen der Reaktion erfolgte durch 50 µl 2 M H₂SO₄. Die optische Dichte (OD) wurde bei einer Wellenlänge von 450 nm im Plattenphotometer bestimmt. Die Klone mit den höchsten Signalstärken im ELISA wurden weiter in Kultur gehalten, die anfallenden Zellkulturüberstände gesammelt und die darin enthaltenen Antikörper im immunologischen Test (s. 2.3) auf Spezifität und Sensitivität getestet.

2.3 Charakterisierung und Aufreinigung der monoklonalen Antikörper

Die Zellkulturüberstände der anhand von ELISA-Analysen ausgewählten Klone wurden im Dot Blot und Western Blot getestet. Alle ausgewählten antikörperhaltigen Überstände wurden auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt. Zur Bestimmung der Sensitivität der monoklonalen Antikörper (MAK) im Dot Blot-Verfahren wurden verschiedene Mengen des Zielpeptids (z.B. von 2 bis 300 ng) in Puffer gelöst und in jeweils gleichen Endvolumina auf eine Nitrocellulose-Membran getropft. Die Spezifität (und die Kreuzreaktivität) wurde überprüft, indem neben hBD17 noch andere Peptide ähnlicher Struktur (z.B. hBD30) oder ähnlicher Größe (z.B. CRF) "gedotet" wurden. Nach dem Eintrocknen der Proben wurde die Membran in 1x Roti-Block zur Absättigung der unspezifischen Proteinbindungsstellen 1 h bei RT inkubiert. Die folgenden Inkubations- und Waschschriffe entsprachen denen, die bei der immunologischen Detektion

geblotteter Proteine im Western Blot vorgenommen wurden (s.u.).

Für die Untersuchung der MAK auf Spezifität und Sensitivität im Western Blot wurden synthetisches hBD17 und andere synthetische Peptide (hBD30, CRF) in einer entsprechenden Menge ddH₂O gelöst und mit 0,33 Teilen 4× Lithium-Dodecyl-Sulfat-(LDS-) Probenpuffer sowie 50 mM DTT versetzt. Nach 10-minütiger Denaturierung bei 70 °C wurden 5-100 ng Peptid pro Spur auf das Gel aufgetragen und unter den gleichen Bedingungen wie Proteingemische (z.B. Proben aus Peptidbank-Fraktionen) einer Elektrophorese und einem anschließenden Proteintransfer unterzogen. Dieses erfolgte in Analogie zu der in Abschnitt 2.6 geschilderten Methodik.

Die Aufreinigung der hBD17-spezifischen Antikörper erfolgte affinitätschromatographisch auf einer Protein A-Säule (ImmunoPure® Immobilized Protein A, Fa. Pierce, Rockford, USA). Eine geeignete Menge an Zellkulturüberstand wurde dazu über Cellulose-Acetat-Phthalat(CAP)-Membranfilter sterilfiltriert (Filtropur, Sarstedt, Ø 0,22 µm). Dann wurden zu 45 Teilen Filtrat langsam bei 4 °C 55 Teile kalte, gesättigte Ammoniumsulfatlösung gegeben und ÜN gerührt, um die enthaltenen Proteine zu fällen. Das Präzipitat wurde bei 4 °C und 8.000 x g abzentrifugiert und anschließend in 10 ml 100 mM Tris/HCl pH 8,9 resuspendiert. Diese Lösung wurde ÜN bei 4 °C gegen 1 l 100 mM Tris/HCl pH 8,9 dialysiert (Molekulargewichts-Ausschluß (MWCO) 7.000 Da), um niedermolekulare organische Verbindungen und Salze abzutrennen. Nachfolgend wurde das Dialysat erneut bei 4 °C und 8.000 x g für 20 min zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Sediment (Zelltrümmer, Lipide etc.) verworfen. Der Überstand wurde mit kristallinem NaCl auf eine Konzentration von 3 M NaCl eingestellt.

Die Protein A-Säule wurde zunächst mit einem 5-fachen Bettvolumen 100 mM Tris/HCl pH 8,9 äquilibriert, bevor die Beladung mit dem antikörperhaltigen Überstand erfolgte. Anschließend wurde die Säule mit 15 ml 100 mM Tris/HCl pH 8,9 gewaschen. Die Elution von der Säule erfolgte mit 5 ml 0,1 M Zitronensäure (pH 3); es wurden dabei fünf 1 ml-Fraktionen aufgefangen. In jedem Auffanggefäß waren 50 µl 2 M Tris/HCl pH 9 vorgelegt, um eine sofortige Neutralisation des Eluats zu gewährleisten und damit eine mögliche Inaktivierung der Antikörper zu verhindern. Der Proteingehalt der eluierten Fraktionen wurde mit der Bradford-Methode (s. 2.4) bestimmt. Die Fraktionen mit der höchsten Proteinkonzentration wurden ÜN bei 4 °C in einer Mikro-Dialysierkapsel (Roth) über eine Membran mit einer molekularen Ausschlußgröße von 7.000 Da gegen PBS dialysiert. Das Dialysat wurde in der Immunoblot-Analyse, wie unter 2.3 beschrieben, auf Spezifität und Sensitivität getestet; ebenso wurde die geeignete Verdünnung der Antikörper-Lösung austitriert.

2.4 Proteinbestimmung

Die Bestimmung von Proteinkonzentrationen wurde nach BRADFORD (1976) durchgeführt. Dieser Test basiert auf einer Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffs Coomassie-Blau von 470 nm zu 595 nm, die aus der Bindung des Farbstoffs an aromatische oder basische Aminosäuren von Proteinen resultiert. Als Referenz diente eine Eichreihe mit einer Proteinlösung bekannter Konzentration.

Die zu messende Proteinprobe wurde mit ddH₂O auf ein Endvolumen von 20 µl aufgefüllt, mit 200 µl Farbreagenz gemischt und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nachfolgend wurde die Extinktion bei einer Wellenlänge von 595 nm im Plattenphotometer (Fa. Dynex, Modell MRX) bestimmt. Als Nullwert diente ein Ansatz aus 20 µl ddH₂O und 200 µl Farbreagenz. Als Eichreihe wurden 0-600 µg/ml Verdünnungen einer BSA-Stammlösung (2 mg/ml) eingesetzt. Alle Messungen wurden in Dreifachbestimmungen vorgenommen. Die unbekannte Proteinmenge konnte so anhand der graphischen Darstellung der im Rahmen einer Eichreihe gemessenen Werte ermittelt werden.

Farbreagenz:

100 mg Coomassie Brilliant Blue G 250
50 ml 95 % Ethanol
100 ml 85 % Phosphorsäure
850 ml ddH₂O

Aufbewahren der Lösung im Dunkeln bei 4 °C nach Filtration durch Faltenfilter.

2.5 Herstellung von Peptidbanken aus humanem Ejakulat

Bei der Verfolgung von in der Ausgangs-Peptidbank (aus 130 ml humanem Sperma) detektierten Aktivitäten ergaben sich Hinweise, daß die Menge des enthaltenen Zielpeptids für eine erfolgreiche Aufreinigung zu gering sein könnte. Aus diesem Grunde wurden 2 Peptidbänke aus 280 ml humanem Sperma generiert. Im Unterschied zur vorhandenen Sperma-Peptidbank wurde dabei als erster Schritt eine Trennung von Seminalflüssigkeit und Spermien vorgenommen und daraus jeweils eine separate Peptidbank hergestellt.

2.5.1 Beschaffung des Materials

Um die Peptidbänke aus einer möglichst großen Menge an Rohmaterial (humanes Ejakulat) erstellen zu können, wurden niedersachsenweit *in vitro* Fertilisations (IVF)-Labore, reproduktionsmedizinische Kliniken und Institute sowie Kinderwunschzentren kontaktiert. An

diese Institutionen wurde die Bitte gerichtet, nicht mehr benötigte Restmengen von Spermaproben anonymisiert bei -20 °C zu lagern und der IPF PharmaCeuticals GmbH (IPF) zur Verfügung zu stellen. Zu diesem Zweck wurden zunächst Genehmigungen des Projektes durch die Ethikkommissionen der Medizinischen Hochschule Hannover (MHH) und der Niedersächsischen Ärztekammer eingeholt. In einem Informationsblatt für potentielle Spender, das auch als Einverständniserklärung für die Verwendung der jeweiligen Probe zum angegebenen Zweck diente, wurde auf diese Genehmigungen hingewiesen. Der Transport der gesammelten Proben zu den IPF-Laboren erfolgte auf Eis in Kühlboxen, im Hause der IPF wurden die Proben bis zur Aufarbeitung bei -20 °C gelagert. Die zum Zeitpunkt der Generierung der Peptidbänke erlangte Probenmenge betrug 280 ml. Nach den persönlichen Mitteilungen einiger Mitarbeiter der entsprechenden Institutionen variierte das Volumen einer üblicherweise anfallenden Spermaprobe zwischen 1,5 und 2 ml. Die Gesamtheit der gesammelten Proben dürfte sich demnach aus ungefähr 140 bis 180 einzelnen Spenden zusammensetzen.

2.5.2 Trennung von Spermatozoen und Seminalflüssigkeit

Die Ejakulat-Proben wurden bei 4 °C aufgetaut und vereinigt. Um eine erste Trennung von Spermien und Seminalplasma zu erreichen, wurde das Ejakulat bei 16.000 x g und 4 °C 40 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und der Bodensatz zweimal mit je 50 ml eiskaltem Extraktionspuffer gewaschen (16.000 x g, 10 min). Die Überstände wurden mit dem Überstand der ersten Zentrifugation vereinigt. Anschließend wurde das entstandene Sediment (Spermatozoen) in 300 ml kaltem Extraktionspuffer resuspendiert.

Extraktionspuffer:

1 M Essigsäure
20 mM Ascorbinsäure
1 mM EDTA
2 M NaCl
auf pH 2,0 einstellen

2.5.3 Präparation der Rohextrakte

Die Homogenisierung des resuspendierten Spermatozoen-Sediments erfolgte mit einem Ultra-Turrax bei einer Drehzahl von anfangs 13.500 rpm für 1 min und folgend 20.500 rpm für eine weitere Minute. Das Homogenisat wurde ÜN bei 4 °C gerührt. Eine erste Abtrennung der festen Zellfragmente erfolgte durch eine Zentrifugation bei 16.000 x g und 4 °C, der Überstand wurde dekantiert. Das Pellet wurde mit 200 ml kaltem Extraktionspuffer resuspendiert und über 2 h bei 4 °C gerührt. Es schloß sich eine erneute 30-minütige Zentrifugation bei 16.000 x g und 4 °C an.

Der angefallene Überstand wurde mit dem im vorherigen Schritt gewonnenen Überstand vereinigt. Der Niederschlag wurde mit 150 ml kaltem Extraktionspuffer resuspendiert und wiederum für 1 h bei 4 °C gerührt. Zur endgültigen Fällung fester Bestandteile wurde das resuspendierte Pellet ein weiteres Mal für 30 min bei 4 °C bei 16.000 x g zentrifugiert, die Überstände wurden vereinigt und mit Diafiltrationspuffer auf ein Endvolumen von 2 l verdünnt.

Die das Seminalplasma enthaltenden, vereinigten Überstände wurden zunächst mit dem gleichen Volumen des kalten Extraktionspuffers versetzt und dann auf ein finales Volumen von 5 l mit Diafiltrationspuffer aufgefüllt.

Beide Ansätze wurden mittels Ultrafiltration in einer Sartocoon Mini-Anlage (Fa. Sartorius, Göttingen) auf ein Volumen von 500 ml rekonzentriert. Nach dem Verdünnen der Proben mit Diafiltrationspuffer auf jeweils 1 l erfolgte die Diafiltration (Ausschluß 50 kDa) in Abhängigkeit vom Proteingehalt für 35 min (Spermatozoen) bzw. 60 min (Seminalflüssigkeit). Die so gewonnenen Permeate, welche die extrahierten Peptide enthielten, wurden bis zur weiteren Aufarbeitung bei 4 °C gelagert.

Diafiltrationspuffer:

0,1 M Essigsäure
2 mM Ascorbinsäure
0,1 mM EDTA
auf pH 2,85 einstellen mit HCl

2.5.4 Präparative Chromatographie zur Herstellung der Peptidbanken

2.5.4.1 pH-Stufenelution

Die aus der Ultrafiltration/Diafiltration resultierenden Permeate wurden mit VE-H₂O auf 34 l (Spermatozoen) bzw. 22 l (Seminalplasma) verdünnt und mit HCl auf einen pH-Wert von 2,5 eingestellt. Die Proben wurden nachfolgend ÜN auf eine Kationen-Austauscher-Säule aufgetragen und dann stufenweise mit neun verschiedenen Puffern eluiert.

Die Proteinkonzentrationen der einzelnen Eluate und des Durchlaufs wurden mittels der Bradford-Methode (2.4) bestimmt. Die Lagerung bis zur weiteren Aufarbeitung erfolgte bei -20 °C.

Anlage:	BioCAD [®] 250, PerSeptive Biosystems (Freiburg)
Säule:	Vantage 60, Amicon (England), 860 ml
Chromatographiematerial:	Fractogel TSK SP 650 (M) Merck (Darmstadt)
Flußrate:	60 ml/min
Detektionswellenlängen:	214 und 280 nm

Verwendete Eluenten:	0,1 M Zitronensäure, pH 3,6
	0,1 M Essigsäure, 0,1 M Natrium-Acetat, pH 4,5
	0,1 M Maleinsäure, pH 5
	0,1 M Bernsteinsäure, pH 5,6
	0,1 M Natriumdihydrogenphosphat, pH 6,6
	0,1 M Dinatriumhydrogenphosphat, pH 7,4
	0,5 M Ammonium-Acetat, pH 7,0
	VE-H ₂ O, pH 2,5 mit HCl eingestellt
	0,1 M NaOH

2.5.4.2 Präparative Reverse Phase (RP) Chromatographie

Die Eluate 5 bis 9 der pH-Stufenelution der Spermatozoenproben wurden zu Pool 5, die Eluate 7 bis 9 der Seminalplasmaproben zu Pool 7 zusammengefaßt; der Durchlauf bildete den Pool 0. Die resultierenden Pools der Elutionen (mit einem Volumen von 1,2 bis 30 l) wurden anschließend durch Reverse Phase Chromatographie (RP) weiter aufgetrennt.

Anlage:	BioCAD [®] 60, PerSeptive Biosystems (Freiburg)
Säulendimensionen:	47 x 300 mm
Chromatographiematerial:	C 18 Vydac (10-20 µm, 300 Å), Separations Group (USA)
Flußrate:	40 ml/min
Laufmittel A:	10 mM HCl in VE-H ₂ O
Laufmittel B:	80 % (v/v) Acetonitril, 10 mM HCl, 20 % (v/v) VE-H ₂ O
Gradient:	von 0 % B bis 60 % B in 48 min, von 60 % B bis 100 % B in 3 min
Detektionswellenlängen:	214 und 280 nm
Fraktionsgröße:	50 ml

Die durch diese präparative RP-Chromatographie entstandene Spermatozoen-Peptidbank umfaßte 210 Fraktionen (fünf pH-Pools zu je 42 Fraktionen), die Seminalplasma-Peptidbank 294 Fraktionen (sieben pH-Pools zu je 42 Fraktionen). Je 1,4 ml Gewebeäquivalent entsprechende Aliquots der Peptidbankfraktionen wurden abgenommen und ebenso wie die Stammfraktionen lyophilisiert. Diese Aliquotsätze wurden auf immunologische Aktivitäten (s. 2.6) getestet. Die Aliquots, die ein spezifisches Signal im Western Blot hervorriefen, wurden weiter untersucht. Die korrespondierenden Ursprungsfraktionen wurden jeweils weiter chromatographisch aufgereinigt.

2.6 Screening der Peptidbanken

Das Durchsuchen der Peptidbanken auf das Vorhandensein von hBD17 erfolgte mittels Immunoblot-Analyse (Western Blot) unter Verwendung der generierten spezifischen Antikörper (s. 2.2). Zunächst wurden Aliquotsätze der Pools, aus denen sich die Peptidbanken zusammensetzten, in diesem immunologischen Test auf spezifische Aktivitäten untersucht. Konnte eine Aktivität in den Aliquots einer oder mehrerer Fraktionen gefunden werden, wurde die Analyse mit den entsprechenden Stammfraktionen reproduziert. So konnten eventuelle Verwechslungen während des Aliquotierens ausgeschlossen werden. Die Aktivitäten wurden nachfolgend durch chromatographische Aufreinigungen dieser Ursprungsfraktionen und erneute Immunoblot-Analysen weiter verfolgt, bis eine sequenzierbare Menge (≥ 10 pmol) einer möglichst reinen, immunreaktiven Substanz gewonnen werden konnte.

2.6.1 Probenvorbereitung

Zur Untersuchung der Sensitivität und Spezifität der monoklonalen hBD17-Antikörper wurden synthetische humane β -Defensine in ddH₂O gelöst und mit 0,25 Teilen 4× Lithium-Dodecyl-Sulfat-(LDS-) Probenpuffer sowie 50 mM DTT versetzt. Nach 10-minütiger Denaturierung bei 70 °C wurden 5-100 ng Peptid pro Spur auf das Gel aufgetragen.

Um die Vergleichbarkeit der Versuche zu gewährleisten, mit denen die Peptidbanken auf immunologische Aktivitäten getestet wurden, mußten gleichwertige Mengen an Gewebeäquivalent eingesetzt werden. Dazu wurde der Peptidgehalt der einzelnen Pools anhand der Chromatogramme und der nach der pH-Stufenelution (s. 2.5.4.1) vorgenommenen Proteinbestimmung (2.4) abgeschätzt. Die lyophilisierten Aliquots der Fraktionen der Pools wurden daher zunächst in einer entsprechenden Menge ddH₂O resuspendiert, so daß gleiche Mengen der resuspendierten Fraktionen unterschiedlicher Pools gleichen Äquivalenten an Gewebe entsprachen. Die im Experiment einzusetzende Probenmenge wurde abgenommen, mit derselben Menge 2x LDS-Probenpuffer und 10 % 0,5 M DTT gemischt und für 10 Minuten bei 70 °C denaturiert. Je nach Größe der Kavitäten wurde das Gel mit 10-20 µl Probe pro Spur beladen. Für die Verifizierung einer im Aliquotsatz eines bestimmten Pools detektierten immunologischen Aktivität wurden die Proben aus den entsprechenden lyophilisierten Ursprungsfraktionen einer Peptidbank in analoger Weise behandelt.

2.6.2 Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Trennung in der SDS-PAGE erfolgt ausschließlich nach dem Molekulargewicht der Moleküle. Das aus der Beladung mit dem anionischen Detergenz SDS (Solubilisierung) resultierende Ladungs-/Masse-Verhältnis der SDS-Protein-Micellen ist für alle Proteine, mit Ausnahme von Glycoproteinen, gleich (GUTTMAN, 1996). Eine anschließende Reduktion der Disulfidbrücken zu Sulfhydrylgruppen unter Verwendung von 0,5 M Dithiothreitol (DTT) bewirkt eine Destruktion der Quartär- und Tertiärstruktur und damit eine ausschließliche Trennung nach dem Molekulargewicht und nicht nach der räumlichen Struktur.

Polyacrylamid-Gele werden durch Polymerisation von Acrylamid mit dem quervernetzenden N,N'-Methylen diacrylamid hergestellt. Zum Starten der Reaktion wird ein Radikalstarter benötigt. Der Vernetzungsgrad wird durch die Konzentration der quervernetzenden Substanz eingestellt und ist in hohem Maße reproduzierbar. Die geringe Porengröße des Gels verhindert die Diffusion der Probenmoleküle und ermöglicht eine hochauflösende Auftrennung. Solche Gele werden auch als restriktive Gele bezeichnet (im Gegensatz zu Agarose-Gelen). Der Prozeß ist nicht reversibel, eine Rückgewinnung von Substanzen aus dem Gel ist daher schwierig. Die Konzentration (=Vernetzungsgrad) C des Gels läßt sich nach folgender Formel berechnen:

$$C = \frac{b \times 100}{a+b} \quad [\%]$$

a = Masse Acrylamid in g, b = Masse Methylen diacrylamid in g

Über den Vergleich mit einem Standardgemisch aus Proteinen mit definiertem MG, dem sogenannten Größenmarker, erfolgt eine Abschätzung des MG der aufgetrennten Proteine.

In der vorliegenden Arbeit wurden kommerziell erhältliche Fertiggele vom Typ NuPAGE® der Firma Invitrogen™ (Karlsruhe) eingesetzt. Um eine gute Trennleistung der Proteine vom niedermolekularen Bereich (2,5 kDa) bis zu einem MG von 200 kDa zu erzielen, wurde ein Bis(hydroxyethyl)imino-tris(hydroxymethyl)methan (Bis-Tris)-HCl gepuffertes NuPAGE Polyacrylamid-Gel mit einer Totalamidkonzentration von 4-12 % in Verbindung mit einem 2-(N-morpholino)ethansulfonsäure (MES)-SDS-Elektrodenpuffer verwendet. Die Auftrennung von *in vitro* translatierten Proteinen (s. 2.10.2.2) fand in 16%igen Tricin-Gelen unter Verwendung der entsprechenden Novex® Proben- und Laufpuffer statt. Dieses Gel-System beruht auf der Methode von SCHÄGGER und VON JAGOW aus dem Jahr 1987, die durch die Substitution von Glycin durch Tricin im Laufpuffer eine höhere Auflösung bei der Trennung niedermolekularer Proteine und Peptide erzielen konnten.

Nach Beendigung der Gel-Elektrophorese wurden die Proteinbanden in einer Coomassie-Blau-Lösung für 3-6 Stunden fixiert und gefärbt, sofern die entsprechenden Gele nicht geblottet wurden. Die anschließende Entfärbung der Gele erfolgte ÜN in einer Lösung aus 40 % Ethanol und 10 % Essigsäure.

Um den Proteinbanden die entsprechenden Molekulargewichte zuzuordnen zu können, wurde als Größenstandard der "Prestained Protein Marker" der Firma New England Biolabs (NEB) auf mindestens eine Spur jedes Gels aufgetragen.

Coomassie-Blau-Lösung:

0,2 %	Coomassie Brilliant Blue R-250
0,05 %	Coomassie Brilliant Blue G-250
42,5 %	Ethanol
5 %	Methanol
10 %	Essigsäure

2.6.3 Immunoblot-Analyse (Western Blot)

Die Überführung der wie oben beschrieben aufgetrennten Proteine vom Gel auf eine PVDF-Membran erfolgte durch elektrophoretischen Transfer im sogenannten '*Wet Blot*'-Verfahren. Dazu wurden die PVDF-Membran (0,2 µm Porengröße, NEN) und das Polyacrylamidgel so zwischen je zwei transferpuffergetränkten Schwämmen ('*Blotting Pads*') und Filterkartons (Whatman 3MM, Roth) im '*XCell II Blot Module*' (Invitrogen) angeordnet, daß die Membran näher zur Anode und das Gel näher zur Kathode lag. Das '*Blot Module*' wurde anschließend in die Blotkammer eingespannt und mit ca. 50 ml Transferpuffer vollständig befüllt. In die so entstandene äußere Kammer wurden zu Kühlzwecken etwa 800 ml destilliertes Wasser gegeben. Der Transfer erfolgte bei konstant 30 V über 60 min. Die Gele wurden nachfolgend einer Coomassie-Färbung (s.o.) unterzogen, um die Effektivität des Transfers zu beurteilen.

Transferpuffer:

50 ml	20× NuPAGE Transfer Buffer (Invitrogen)
1 ml	NuPAGE Antioxidans (Invitrogen)
200 ml	Methanol
749 ml	ddH ₂ O

Zur Beseitigung methanolischer Rückstände wurde die Membran anschließend dreimal für jeweils 5 min in TBS-Tween gewaschen. Unspezifische Proteinbindungsstellen auf der Membran wurden abgesättigt, indem der Blot unter leichtem Schütteln mindestens 1 h mit synthetischem Blockierreagenz (1× Roti-Block-Lösung (Roth)) bei RT inkubiert wurde. Die

"geblockte" Membran wurde in ein 50 ml Röhrchen überführt, in welchem 4,5 ml des den Erstantikörper enthaltenden Hybridoma-Zellkulturüberstand und 0,5 ml 10x Roti-Block-Lösung vorgelegt waren. Die Bindung des primären Antikörpers erfolgte ÜN bei 4 °C und langsamer Rotation des Röhrchens auf einem Rollmischgerät (VWR).

Nach der Entfernung von überschüssigem Erstantikörper durch dreimaliges Waschen mit TBS-Tween wurde die Membran in Zweitantikörperlösung (1:25.000 bzw. 1:50.000 in 1× Roti-Block) für mindestens 1 h bei RT inkubiert. Vor der Visualisierung der Zweitantikörper-Bindung wurde abschließend fünfmal für mindestens 5 min mit TBS-Tween gewaschen. Die Visualisierung basiert auf der Oxidation von Luminol zu einem lichtemittierenden Produkt, die durch das an den Zweitantikörper gekoppelte Enzym Meerrettichperoxidase katalysiert wird. Dazu wurde der Blot für 1 min mit 1,5 ml frisch angesetzt, luminolhaltigen Detektionsreagenz (Super Signal, Pierce) benetzt, luftblasenfrei in eine dünne Polyethylenfolie eingewickelt und auf einem Röntgenfilm (CL-X Posure, Pierce) exponiert. Die Expositionszeit betrug je nach Signalintensität 1 min bis 12 h. Der Film wurde anschließend mit Agfa Rodinal (1:25) entwickelt, über die doppelte Entwicklungszeit fixiert (Agfa Tetenal Superfix I 1:7), gewässert und im Warmluftstrom getrocknet.

Zur genauen Zuordnung der Signale auf dem Film zu den entsprechenden Spuren des Blots und zur Abschätzung der Proteinbeladungen wurden die Membranen abschließend mit '*India Ink*'-Lösung (Pelikan, Hannover) gefärbt. Dazu wurden mit ddH₂O gespülte PVDF-Membranen über 2 h bei RT in '*India Ink*'-Lösung geschüttelt und mit 1× TBS-Tween bis zur Entfärbung des Hintergrundes gewaschen.

10x TBS (Tris-gepufferte Kochsalzlösung):

24,2 g Tris
80 g NaCl

Einstellen des pH-Wertes mit ca. 20 ml 25 % HCl auf 7,6, anschließend mit ddH₂O 1000 ml auffüllen.

1x TBS-Tween:

100 ml 10× TBS
1 ml Tween-20
900 ml ddH₂O

'India Ink'-Lösung:

50 ml TBS-Tween
0,1 ml Fount India Ink (Pelikan)

2.7 Isolierung immunologisch detektierter Peptide

Die im Primärscreening in den Fraktionen der Peptidbanken detektierten immunologischen Aktivitäten wurden verfolgt, indem die entsprechenden Fraktionen durch eine Abfolge weiterer Chromatographieschritte bis möglichst zur Reinsubstanz aufgereinigt wurden. Die nach jedem Isolationschritt entstandenen Proben wurden in der Immunoblot-Analyse auf Persistenz und Lokalisation der immunologischen Aktivität getestet.

2.7.1 Reverse Phase HPLC

Die gefriergetrockneten Peptidbankfraktionen wurden in Laufmittel A gelöst und die unlöslichen Bestandteile durch Filtration (Minisart 0,2 µm, Sartorius, Göttingen) abgetrennt. Die Trennung des Peptidgemisches erfolgte durch einen linearen Anstieg von Solvent B im Elutionsmittel. Zur Herstellung der Puffer wurde entmineralisiertes Wasser aus einer Reinstwasseranlage (Millipore, Eschborn) verwendet. Die Laufmittel wurden vor der Verwendung 10 min durch Heliumbehandlung entgast. Die Säulen wurden nach Gebrauch in 20 % Methanol gelagert. Zur Auftrennung der biologisch aktiven Fraktionen wurden sukzessive folgende Chromatographien durchgeführt:

Rechromatographie 1:

Anlage:	Kontron 422 S (Henningen)
Säulendimensionen:	10 x 250 mm
Chromatographiematerial:	C 18 Vydac (5 µm, 300 Å), Separations Group (USA)
Flußrate:	2 ml/min
Laufmittel A:	0,1 % Trifluoressigsäure (TFA)
Laufmittel B:	0,1 % TFA, 80 % Acetonitril (ACN)
Gradient:	von 20 % B bis 60 % B in 60 min
Detektionswellenlängen:	214 und 280 nm
Fraktionsgröße:	2 ml

Rechromatographie 2:

Anlage:	ABI 140 D, Perkin Elmer (Wellesley, USA)
Säulendimensionen:	1 x 150 mm
Chromatographiematerial:	Jupiter RP C18, 1 x 150 mm, 300 Å, 5 µm Phenomenex (Aschaffenburg)
Flußrate:	20 µl/min
Laufmittel A:	0,1 % Trifluoressigsäure (TFA)
Laufmittel B:	0,1 % TFA, 80 % ACN
Gradient:	von 20 % B bis 60 % B in 60 min
Detektionswellenlängen:	214 und 280 nm
Fraktionsgröße:	20 µl

Bei der Verfolgung einer zweiten Isolationsstrategie wurde eine immunologisch aktive Fraktion aus der 1. Rechromatographie zunächst mittels Kationen-Austausch-Chromatographie (s. 2.7.2) aufgetrennt. Die daraus hervorgegangenen immunreaktiven Fraktionen wurden nach folgendem Schema chromatographiert:

Anlage:	Kontron 422 S (Henningen)
Säulendimensionen:	2 x 250 mm
Chromatographiematerial:	Luna RP C18, 300 Å, 5 µm Phenomenex (Aschaffenburg)
Flußrate:	180 µl/min
Laufmittel A:	0,1 % Trifluoressigsäure (TFA)
Laufmittel B:	0,085 % TFA, 80 % ACN
Gradient:	von 10 % B bis 70 % B in 60 min
Detektionswellenlängen:	214 und 280 nm
Fraktionsgröße:	180 µl

2.7.2 Kationen-Austausch-HPLC

Die als dritter Aufreinigungsschritt durchgeführte Kationen-Austausch-Chromatographie erfolgte unter den nachstehenden Bedingungen; die verwendeten Elutionspuffer wurden vor der Verwendung über 10 min mit einem Heliumstrom entgast:

Anlage:	Kontron 422 S (Henningen)
Säulendimensionen:	4 x 125 mm
Chromatographiematerial:	Parcosil PepKat, 300 Å, 5 µm, Biotek (Östringen)
Flußrate:	700 µl/min
Laufmittel A:	50 mM KH ₂ PO ₄ , pH 4,5
Laufmittel B:	1,5 M KCl, 50 mM KH ₂ PO ₄ , pH 4,5
Gradient:	von 0 % B bis 70 % B in 70 min
Detektionswellenlängen:	214 und 280 nm
Fraktionsgröße:	700 µl

Um die Fraktionen analytisch testen und mittels RP-Chromatographie weiter aufreinigen zu können, war eine Reduktion des Salzgehaltes der Eluate notwendig. Die Entsalzung der Proben erfolgte nach dem Prinzip der RP-Chromatographie. Die Kavitäten einer 96-Loch-Extraktionsplatte (3M EmporeTM 96 Well Extraction Disks, 3M Filtration Products, St. Paul) enthalten zwischen zwei Fritten RP C-18-Material. Zum Entsalzen der Probelösung wurde ein Aliquot der einzelnen Fraktionen in eine der Kavitäten pipettiert. Die Peptide binden an das Reverse Phase-Material. Durch Spülen des RP-Materials mit 600 µl Eluent A (0,1 % TFA) wurde das gelöste Salz, welches nicht an das RP-Material bindet, abgetrennt. Die Peptide wurden anschließend mit 600 µl Fließmittel B (0,1 % TFA in 80 % ACN) eluiert. Die entsalzten Proben wurden lyophilisiert und für die weiteren Versuche in ddH₂O resuspendiert. Die Extraktionsplatten wurden nach ihrer Verwendung mit 100 % ACN regeneriert und in 30 % Methanol gelagert.

2.8 Analytische Untersuchungen der immunreaktiven Proteine

Die mit den chromatographischen Methoden gereinigten immunreaktiven Fraktionen wurden den im folgenden aufgeführten analytischen Untersuchungen unterzogen, um die enthaltenen Verbindungen zu identifizieren und die Reinheit der Proben zu bestimmen.

2.8.1 '*Matrix-assisted laser desorption/ionisation-time of flight*' (MALDI-TOF)

Bei der '*Matrix-assisted laser desorption/ionisation*'-Massenbestimmung entstehen vorwiegend einfach geladene Ionen. Dies ermöglicht die Analyse der Massenzusammensetzung komplexer Peptidmischungen mittels '*Matrix-assisted laser desorption/ionisation-time of flight*' (MALDI-TOF)-Analyse. Die Bestimmung des Molekulargewichts mit dem MALDI-TOF-Massenspektrometer (LaserTec RBT II, PerSeptive/Vestec, Houston) erfolgte im linearen Modus mit einem Stickstofflaser (337 nm). Jeweils 1 µl Matrix und 1 µl salzfreie Probe wurden auf den Probenträger pipettiert, gemischt und im Luftstrom getrocknet. Als Matrix-bildende Substanz wurde eine gesättigte Lösung von α -Cyano-4-hydroxymizinsäure und Fucose (1:1) verwendet (SCHRADER *et al.*, 1997). Die Steuerung des Spektrometers und die Auswertung der Spektren erfolgte mit dem Programm Voyager Biospectrometry Workstation Version 3.07.1 (PerSeptive Biosystems, Vestec, Houston).

2.8.2 Kapillarzonenoelektrophorese

Die Kapillarzonenoelektrophorese stellt eine hochauflösende Analysenmethode zur Reinheitsüberprüfung von Peptiden dar. Dabei erfolgt die Trennung der ionisierten Probeteilchen aufgrund von Mobilitätsunterschieden, die durch Größen- und Ladungsunterschiede der Ionen entstehen. Die Messungen wurden mit der P/ACETM MDQ-Anlage (Beckman, München) vorgenommen. Durch Anlegen eines geringen Überdrucks für 10 s wurde in die Kapillare ein Probenvolumen von 6 nl injiziert. Die Messung erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 120 µA, die aus einer angelegten Hochspannung von 22-27 kV resultierte. Die Temperatur der Kapillare wurde mittels Flüssigkeitskühlung bei konstant 25 °C gehalten. Als Puffer wurde 100 mM NaH₂PO₄ mit 0,02 % Hydroxypropylmethylcellulose verwendet, der mit Phosphorsäure auf einen pH-Wert von 2,5 eingestellt war. Die Trennung der Peptide erfolgte in einer 57 cm langen, unbeschichteten '*fused silica*' Kapillare (Typ TSP 075375, Composite Metal Services Ltd. UK). Die Detektionswellenlänge betrug 214 nm. Die Elektropherogramme wurden mit der

Software "P/ACE System MDQ" (Beckman) ausgewertet.

2.8.3 Sequenzierung der Peptide

Die Peptidsequenzierung erfolgte durch die klassische Aminosäuresequenzanalyse auf der Basis des Edman-Abbaus. Zur Sequenzierung wurde ein automatischer Edman-Sequenzer (Applied Biosystems Modell 473A, ABI, Weiterstadt) eingesetzt. Die Aufnahme der Daten und deren Auswertung erfolgte mittels der „Model 610A Data Analysis Software“ (Version 1.2.1, ABI, Weiterstadt). Zwischen zwei Filterplättchen aus BioPrenTM wurden zwischen 10 pmol und 100 pmol Peptid appliziert. Das eigentliche Reaktionsvolumen bildete sich zwischen den Filterplättchen aus. Dort wurden die Reagenzien (Phenylisothiocyanat, TFA, Chlorbutan) eingebracht. Die Analyse und Detektion der Aminosäuren erfolgte mittels Reverse Phase Chromatographie bei einer Wellenlänge von 256 nm.

2.9 Immunhistochemische Untersuchungen

Die Immunhistochemie ermöglicht die Detektion und Visualisierung von Antigenen in Zellen und Gewebeschnitten durch spezifische monoklonale oder polyklonale Antikörper. In der vorliegenden Arbeit wurden biotinylierte Zweitantikörper eingesetzt, um β -Defensine in Gewebeschnitten zu detektieren. Dabei binden freie Bindungsstellen des peroxidasegekoppelten Avidins an das Biotin, welches an den Sekundärantikörper gekoppelt ist. Als Chromogen für die Reaktion wurde DAB (3,3 Diaminobenzidin; DAKO, Dänemark) eingesetzt, das von der Meerrettichperoxidase zu einem braun gefärbten Produkt umgewandelt wird (CHILDS und UNABIA, 1982).

2.9.1 Gewebepräparation

Die Gewebeproben aus dem Nebenhoden wurden über 24 h bei 4 °C in 4 % Paraformaldehyd bei einem pH-Wert von 7,2 fixiert und ÜN bei 4 °C in PBS gewaschen. Der Wasserentzug aus dem Gewebe erfolgte durch ÜN-Inkubation bei RT und unter langsamen Schütteln in Ethanol-Lösungen der folgenden aufsteigenden Konzentrationen: 50 %, 70 %, 80 %, 90 %, 96 %.

Nach der Dehydrierung wurden die Proben zunächst für 1 h bei RT in Chloroform inkubiert, dann ÜN in einer Chloroform/Paraffin-Lösung (1:1). Die vollständige Einbettung erfolgte über 18 h Inkubation bei 65 °C in reinem Paraffin, wobei die Paraffinschmelze achtmal gewechselt wurde. Das Erstarren der Paraffinschmelze mit der darin enthaltenen Probe wurde durch eine schnelle Absenkung der Inkubationstemperatur auf einer Kühlplatte (Modell EG1140 C,

Fa. Leica) erreicht.

2.9.2 Präparation der eingebetteten Schnitte

Die eingebetteten Gewebeproben wurden mit einem Mikrotom (Microm HM340, Heidelberg) auf eine Dicke von 5 µm geschnitten. Die Schnitte wurden auf Objektträger (SuperFrost Plus, Menzel-Glaeser) aufgezogen und durch eine dreimalige Inkubation für je 7 min in Rothistol (Roth) von Paraffin befreit. Die Rehydrierung des Gewebes erfolgte durch zweiminütige Inkubation bei RT in Ethanol-Lösungen der folgenden absteigenden Konzentrationen: 96 %, 90 %, 80 %, 70 %, 50 %, 30 %.

Die Schnitte wurden dreimal für je 2 min in ddH₂O inkubiert, um Ethanolreste zu entfernen und anschließend in PBS äquilibriert. 4,7 ml einer '*Unmasking Solution*' (Vector Laboratories) wurden mit ddH₂O auf 500 ml aufgefüllt. Die Gewebeschnitte wurden dreimal für je 3 min in dieser Lösung gekocht und wieder auf 30 °C abgekühlt. Daran schloß sich ein achtminütiger Waschschrift in PBS an. Die Proben wurden 15 min in 3 % H₂O₂ inkubiert, um endogene Peroxidasen zu inaktivieren, die unspezifische Signale verursachen können. Nachfolgend wurden die Objektträger zweimal für 4 min in PBS-T (0,2 % Tween 20) gewaschen. Zur Absättigung unspezifischer Antikörperbindungsstellen erfolgte eine einstündige Inkubation in PBS-T/10 % FCS. Die Objektträger wurden ÜN bei 4 °C mit dem unverdünnten, antikörperhaltigen Zellkulturüberstand inkubiert. Als Positivkontrolle diente Endothelin-1 (ET-1) als Antigen in Verbindung mit einem monoklonalen Antikörper (Oncogenes, CN Biosciences LTD, England). Ansätze mit einem Isotyp-IgG (Sigma) bzw. ohne Primäantikörper bildeten die Negativkontrollen. Die Schnitte wurden dreimal für 5 min in PBS-T gewaschen. Ein Tropfen (ca. 50 µl) einer biotinylierten Anti-Maus-Zweitantikörperlösung (Vectastain ABC kit Elite, Mouse IgG, Vector Laboratories, England) wurde in 2,5 ml PBS-T verdünnt, mit einem Tropfen (ca. 50 µl) Blockierungs-Serum versetzt und auf die Schnitte gegeben. Die Sektionen wurden zweimal für 10 min mit PBS-T gewaschen. Es folgte eine 30-minütige Inkubation bei RT mit dem '*ABC Vectastain Reagent*', das den Avidin-Biotin-Enzym-Komplex enthält. Nach zwei weiteren, zweiminütigen Waschschriften wurden die Proben über 3 min mit einer Färbelösung behandelt. Zur Herstellung der Färbelösung wurden eine Tablette Harnstoff-H₂O₂ (Sigma) und eine Tablette 3,3'-Diaminobenzidin (Sigma) in 1 ml PBS gelöst. Es schlossen sich zwei Waschschriffe für 2 min in PBS-T an. Die Schnitte wurden durch Inkubation für jeweils 2 min in Ethanol-Lösungen der folgenden aufsteigenden Konzentrationen dehydriert: 50 %, 70 %, 80 %, 90 %, 96 %.

Nach zweimaliger Inkubation (2 min) in 100 % Xylol erfolgte die Fixierung der Schnitte auf dem Objektträger mit Mowiol-Lösung (48 g Mowiol 488 (Sigma-Aldrich) in 21,1 % Glycerol/0,1 M Tris/HCl, pH 8,5).

2.10 Molekularbiologische Methoden

2.10.1 Klonierung und Sequenzierung von DNA-Fragmenten

2.10.1.1 Verwendete Oligonukleotide

Alle für PCR-Reaktionen (2.10.1.4) und DNA-Sequenzierung (2.10.1.12) verwendeten Oligonukleotide wurden von den Firmen TIB Molbiol (Berlin) oder MWG-Biotech (Ebersberg) bezogen und sind in Tabelle 2 aufgelistet. Die lyophilisierten Oligonukleotide wurden mit sterilem, schwermetallfreiem Wasser ('ACS-grade', Sigma) auf eine Stammkonzentration von 10 pM eingestellt und bei -20 °C gelagert.

Tabelle 2: Übersicht der eingesetzten Oligonukleotide.

Bezeichnung/ Richtung	Oligonukleotidsequenz 5'→3'	Bemerkungen
hBD17 (<i>reverse</i>)	ATC CAC TGG GAG CTT CAT CTG CATT	Oligo für <i>hBD17</i>
hBD17 (<i>forward</i>)	GTG GCA TCG GAC TTG CAG CTT CA	Oligo für <i>hBD17</i>
Vektorprimer RPN	GTAAAACGACGGCCAG	Oligo für pCR 2.1 TOPO-Vektor
Vektorprimer FPN	CAG GAA ACA GCT ATG AC	Oligo für pCR 2.1 TOPO-Vektor
T7-Primer	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG	Sequenzier-Oligo für pCR 2.1 TOPO-Vektor)
M13-Reverse- Primer	CAG GAA ACA GCC ACG AC	Sequenzier-Oligo für pCR 2.1 TOPO-Vektor)
pUC/M13 Reverse Sequencing Primer	CAG GAA ACA GCT ATG AC	Oligo für pGEM-Vektor (Positivkontrolle)

2.10.1.2 Sterilisation von Lösungen und Materialien

Zur Entkeimung wurden hitzestabile Lösungen und Gebrauchsgegenstände für 20 min einer Temperatur von 121 °C bei 2 bar in einem Dampfdruckautoklaven (Bioclav 3021001, Schütt Labortechnik, Göttingen) ausgesetzt. Thermolabile Lösungen wurden sterilfiltriert (Filtropur,

Sarstedt, Porendurchmesser: 0,22 µm oder 0,45 µm). Die Entkeimung von Metall- und Keramikwaren erfolgte über 3 h bei 180 °C trockener Hitze.

Alle Chemikalien und Materialien wurden in Analysenqualität verwendet und stammen, soweit nicht anders angegeben, von den Firmen BioWhittaker, Life Technologies™, Costar/Corning, Falcon, Greiner, Roth und Sigma. Das Ansetzen von Pufferlösungen, Nährmedien und Nähragar erfolgte ausschließlich mit deionisiertem Wasser aus einer Reinstwasseranlage (Milli-Q^{UF} plus, Millipore), während für molekularbiologische Zwecke steriles, schwermetallfreies Wasser ('ACS grade', Sigma) genutzt wurde.

2.10.1.3 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren erfolgte photometrisch durch die Messung der Absorption bei 260 nm in einer Quarzküvette mit einer Schichtdicke von 1 cm (Spektralphotometer DU® 640, Beckmann, München). Die Nukleinsäurekonzentration c ergibt sich aus der gemessenen optischen Dichte (OD_{260}) durch folgende Beziehung:

$$c \text{ [ng/µl]} = OD_{260} \times \varepsilon \times V$$

V = Verdünnungsfaktor der wässrigen Nukleinsäurelösung

ε = Extinktionskoeffizient

ε für dsDNA = 0,05

Die Reinheit von Nukleinsäuren konnte ebenfalls durch photometrische Messungen bestimmt werden. Bei nukleinsäurehaltigen Lösungen, die nicht durch Proteine verunreinigt sind, sollte das Verhältnis $OD_{260\text{nm}}$ zu $OD_{280\text{nm}}$ bei mehr als 1,8 liegen. Weiterhin konnte die Konzentration von Plasmiden oder DNA-Fragmenten im Agarosegel durch den Vergleich der Bandenintensitäten mit DNA-haltigen Proben bekannter Konzentration abgeschätzt werden.

2.10.1.4 Standard-Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Methode der Polymerasekettenreaktion oder '*polymerase chain reaction*' (PCR) ermöglicht es, aus geringsten DNA-Mengen definierte DNA-Abschnitte *in vitro* exponentiell zu vervielfältigen (SAIKI *et al.*, 1985). DNA-abhängige DNA-Polymerasen benötigen als Startpunkt für die Synthese des zur Matrize komplementären Stranges kurze, doppelsträngige Sequenzbereiche. Für die PCR verwendet man zwei synthetische Oligonukleotide ('*primer*'), die jeweils zu einem der beiden Stränge der Matrizen-DNA komplementär sind und die gewünschte Sequenz ('*amplikon*') einschließen ('*sense*'- und '*antisenseprimer*'). Ein Zyklus der Polymerasekettenreaktion beinhaltet die temperaturabhängige Reaktionsfolge von

Denaturierung, Anlagerung und Elongation.

Zunächst wird die zu untersuchende DNA-Matrize (*'template'*) bei hoher Temperatur (94-99 °C) denaturiert und zusammen mit den synthetischen Oligonukleotiden abgekühlt (Anlagerung, *'annealing'*). Während der Anlagerung bilden sich Hybride zwischen der eingesetzten einzelsträngigen DNA und den komplementären Oligonukleotiden. Diese doppelsträngigen DNA-Bereiche fungieren als Startpunkte für eine hitzestabile, DNA-abhängige DNA-Polymerase (z.B. Taq-DNA-Polymerase) zur Synthese des komplementären Stranges (Elongation). Die Elongation der Oligonukleotide findet bei einer Temperatur statt, die über der Schmelztemperatur (T_m) der Oligonukleotide liegt und den Anlagerungsvorgang beendet (52-68 °C). Da das Elongationsprodukt des einen Oligonukleotids im nächsten Zyklus als Matrize zur Synthese des komplementären Stranges dient, wird theoretisch der durch die Oligonukleotide eingeschlossene DNA-Abschnitt nach n-Zyklen um 2^n vermehrt.

Die in dieser Arbeit verwendeten PCR-Protokolle wurden durch Variation der Reaktionszeiten (*'Annealingzeit'*) und der Zyklusanzahlen optimiert. Die Länge der Elongationsphase bei 72 °C richtete sich nach der Größe des zu amplifizierenden DNA-Fragments (ca. 1000 Bp/min). Alle Reaktionen wurden im Gen-Amp Cyclyer 2400 der Firma Perkin Elmer durchgeführt.

Reaktionsansatz für eine Standard-PCR:

10 %	10× PCR-Puffer (200 mM Tris-HCl [pH 8,4], 500 mM KCl)
2 mM	MgCl ₂
200 nM	Oligonukleotide (<i>'sense'</i> und <i>'antisense'</i>)
200 mM	dNTP-Mix (je 200 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP)
7,5 – 200 ng	DNA-Matrize (cDNA, Plasmid oder genomische DNA)
0,75 U	Taq Platinum DNA-Polymerase (Life Technologies)
ad 100 %	ddH ₂ O

Angegeben sind die resultierenden Endkonzentrationen in einem 50 µl Ansatz.

Eine Standard-PCR wurde mit folgendem Temperaturprogramm durchgeführt:

1.	Initiale Denaturierung der Matrize	98 °C	3 min	1 Zyklus
2.	Denaturierung	94 °C	10 s	
	Oligonukleotidanlagerung	52-68 °C	30 s	
	Elongation (Verlängerung)	72 °C	50 s	36 Zyklen
3.	End-Elongation	72 °C	8 min	1 Zyklus
4.	Reaktionsende		4 °C	∞

PCR-Standardansätze wurden in einem Endvolumen von 50 µl durchgeführt. Die Ansätze wurden unmittelbar vor ihrer Verwendung aus den angegebenen Lösungen erstellt, wobei als Matrize Erststränge (cDNA) bzw. PCR-Voramplifikationen fungierten. Die Amplifikationen mit der Taq-Polymerase wurden als *'hot start'* durchgeführt. Die Zugabe der Taq-DNA-Polymerase erfolgte generell in einem geeigneten Volumen (5-10 µl) in 1x Taq-DNA-Polymerase-Puffer bei 78 °C nach einer initialen Denaturierung der PCR-Ansätze von 3 min bei 94 °C. Im letzten Zyklus jeder PCR-Reaktion wurde die Elongationszeit um 5–10 Minuten verlängert, um vollständige Doppelstränge zu generieren. Anschließend wurden die Ansätze bis zu ihrer Entnahme aus dem Gerät bei 4 °C gekühlt.

2.10.1.5 Kolonie-PCR

Die Kolonie-PCR dient der Überprüfung der Länge der insertierten DNA in rekombinanter Plasmid-DNA von Transformanten und stellt somit eine Alternative zum Restriktionsverdau dar. Dazu wurde Zellmaterial von transformierten Bakterienkolonien direkt in ein PCR-Reaktionsgefäß eingebracht und eine Amplifikation mit den FPN/RPN *'sense'*- und *'antisense'*-Vektorprimern durchgeführt. Rekombinante Plasmide ließen sich anhand der Größe des resultierenden PCR-Produktes erkennen. Diese Größe addierte sich aus der Größe des einklonierten DNA-Fragments (*'amplikon'*) und der Größe der von den Oligonukleotiden umschlossenen Sequenz.

PCR-Prä-Mix I (Angaben pro Reaktion):

2 µl	10× PCR-Puffer
0,8 µl	50 mM MgCl ₂
17,5 µl	ddH ₂ O

PCR-Prä-Mix II (Angaben pro Reaktion):

1 µl	10× PCR-Puffer
0,6 µl	MgCl ₂ (50 mM)
0,25 µl	dNTP-Mix (10 mM)
0,25 µl	Oligonukleotidprimer (je 10 µM)
7,5 µl	ddH ₂ O
0,15 µl	Taq Platinum DNA-Polymerase

Mit sterilen 10 µl Pipettenspitzen wurde Zellmaterial aus entsprechenden Bakterienkolonien (2.10.1.10) in PCR-Reaktionsgefäße überführt, die je 20 µl PCR-Prä-Mix I enthielten. Zum Anlegen einer Plattenkultur der zu untersuchenden Transformanten wurde anschließend mit derselben Pipettenspitze ein Impfstrich auf eine Selektions-Agarplatte gebracht. Diese fungierte

später als Ausgangskultur für die Herstellung der Plasmid-Präparation (2.10.1.11). Nach der Denaturierung der überspiralisierten Plasmid-DNA (*'supercoiled DNA'*) bei 99 °C über 10 min und darauf folgender Abkühlung auf 53 °C wurden jeder Reaktion 10 µl PCR-Prä-Mix II hinzugefügt und eine Standard-PCR nach den jeweiligen Gegebenheiten durchgeführt. Der Zwischenschritt bei dieser Reaktion war notwendig, da die Halbwertszeit der Taq-Polymerase bei 99 °C nur wenige Minuten beträgt. Durch die abschließende gelelektrophoretische Trennung der PCR-Produkte konnten die Kolonien mit korrekt rekombiniertem Plasmid identifiziert werden. Mit den entsprechenden Klonen auf der Selektionsplatte konnten Flüssigkulturen angeimpft werden, die anschließend zur Mini-Präparation von Plasmid-DNA verwendet wurden.

2.10.1.6 Gelelektrophoretische Trennung von DNA

Die elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten nach ihrem Molekulargewicht zu präparativen oder analytischen Zwecken erfolgte in nativen, horizontalen Agarosegelen. In Abhängigkeit vom Trennungsziel wurden 0,8-2,0%ige (w/v) Agarosegele in 1× TAE-Puffer mit einer Lauflänge von 8-13 cm hergestellt und die Elektrophorese bei einer angelegten Spannung von 60-120 V in 1× TAE-Laufpuffer durchgeführt. Die Proben wurden zum Absinken in die Geltaschen mit 10 % glycerinhaltigem Auftragspuffer versetzt, dessen Bromphenolblau-Anteil gleichzeitig die Laufront der Elektrophorese kennzeichnet. Zur Visualisierung der DNA unter UV-Licht (254 nm) wurde der Agaroselösung vor dem Gelieren 0,1 µg/ml Ethidiumbromid hinzugefügt. Ein ebenfalls aufgetragener DNA-Größenstandard (1 kbp- bzw. 100 bp-Leiter, Fa. Life Technologies) ermöglichte die Abschätzung der relativen Größe der aufgetrennten DNA-Fragmente. Die Bandenmuster wurden mit dem Kodak EDAS 290-Dokumentationssystem fotografiert und die Bilder in digitaler Form archiviert.

Ethidiumbromid-Stammlösung: 1 mg/ml Ethidiumbromid in ddH₂O

50× TAE-Puffer (Stammlösung):

2 M Tris
100 mM EDTA
1 M Essigsäure

5× Auftragspuffer:

40 % Glycerin
20 mM Tris-HCl (pH 8,0)
2 mM EDTA
0,1 % (w/v) Bromphenolblau

2.10.1.7 Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen

Die Aufarbeitung gelelektrophoretisch getrennter DNA erfolgte mit Hilfe des NucleoSpin Extract-Kits der Fa. Macherey-Nagel (VOGELSTEIN und GILLESPIE, 1979). Das Gelstück, das die jeweilige DNA enthielt, wurde mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten und in ein Eppendorfgesäß überführt. Nach Zugabe von 500 µl Puffer NT1 wurde die Agarose bei 50 °C und 300 rpm für 10 min geschmolzen. Die gesamte Lösung wurde auf eine NucleoSpin Extract-Säule geladen und 1 min bei 8.000 × g zentrifugiert; der Durchfluss wurde verworfen. Anschließend erfolgten zwei einminütige Waschschrte mit 600 bzw. 200 µl EtOH-haltigem Puffer NT3 bei 12.000 × g, bevor die Silikasäule durch zweiminütige Zentrifugation getrocknet wurde. Die Elution der DNA erfolgte nach Inkubation der Säule (1 min, RT) mit 50 µl Tris/HCl (pH 7,5) bei ebenfalls 12.000 × g.

2.10.1.8 Ligation

Als Klonierungsvektoren dienten in der vorliegenden Arbeit das pCR2.1-TOPO-Plasmid und der pcDNA3.1-Vektor (beide Invitrogen). Die Ligation des pCR2.1-TOPO-Plasmid basiert auf der Aktivität der in der Vektorlösung enthaltenen Topoisomerase I aus *Vaccinia*-Viren. Durch dieses Enzym werden die Thymidin-Überhänge im Vektor mit den Adenosin-Überhängen im PCR-Produkt innerhalb von 10 min bei RT miteinander verknüpft. Dazu wurde ein etwa äquimolarer Anteil des aufgereinigten PCR-Produktes zu 5 ng Vektor gegeben und anschließend mit 6× Reaktionspuffer und ddH₂O auf 3 µl Endvolumen aufgefüllt. Nachfolgend wurde die rekombinante DNA in kompetente *Escherichia coli* XL10-Zellen bzw. DH5α-Zellen (Invitrogen) transformiert.

Für die Ligation in den pcDNA3.1-Vektor wurde zu 100 ng bis 200 ng Vektor ein 2- bis 6-facher molarer Überschuß des zuvor über eine NucleoSpin Extract-Säule (2.10.1.7) aufgereinigten PCR-Produktes gegeben. Nach Zugabe von 10× Ligationspuffer und 1 U T4 DNA Ligase (Promega) wurde der 10 µl-Ansatz für mindestens 10 h bei 16-22 °C inkubiert. Die auf diesem Wege erhaltene rekombinante Plasmid-DNA wurde anschließend in kompetente *Escherichia coli*

XL10-Zellen transformiert (2.10.1.10). Als Negativkontrolle wurde anstelle von doppelsträngiger DNA Wasser verwendet, während phosphorylierte Plasmid-DNA als Positivkontrolle diente.

2.10.1.9 Herstellung transformationskompetenter Zellen

Die Herstellung transformationskompetenter Zellen erfolgte in Anlehnung an die Methode von NISHIMURA *et al.* (1990). 1 ml einer '*Epicurian coli XL10-Gold Ultracompetent Cells*'-Übernachtskultur in LB-Medium wurde in 100 ml Medium A überimpft und bei 37 °C unter Schütteln (200 rpm) bis zu einer $OD_{548nm} = 0,55$ inkubiert. Nach zehnmütiger Inkubation auf Eis wurden die Zellen 10 min bei $1500 \times g$ und 4 °C abzentrifugiert und vorsichtig in 1 ml eiskaltem Medium A resuspendiert. 5 ml Medium B (Einfriermedium) wurde tropfenweise unter leichtem Schwenken zum Ansatz gegeben. 100 µl-Aliquots wurden in sterile, vorgekühlte (-80 °C) Eppendorfgefäße pipettiert und bei -80 °C schockgefroren. Die Lagerung der Aliquots erfolgte ebenfalls bei -80 °C.

Luria-Bertani (LB)-Flüssigmedium:

1,0 % Caseinhydrolysat (Sigma C-0626)

0,5 % Hefe-Extrakt (Sigma Y-4000)

0,5 % NaCl

Lösen der Feststoffe in ddH₂O, pH-Wert auf 7.4 mit 1 N NaOH einstellen und autoklavieren.

Medium A:

LB-Flüssigmedium mit Zusatz von: 10 mM MgSO₄

0,2 % Glukose

MgSO₄-Lösung und eine Glukose-Stammlösung über einen Spritzenfilter zum LB-Medium geben.

Medium B:

LB-Flüssigmedium mit Zusatz von: 36 % Glycerin

12 % Polyethylenglykol (PEG 8000)

12 mM MgCl₂

PEG 8000 in Glycerin lösen und zum magnesiumhaltigen LB-Medium geben.

2.10.1.10 Transformation von Plasmid-DNA in kompetente *E. coli*-Zellen

Ein Aliquot der für die Transformation benötigten, kompetenten Bakterienzellen wurde langsam auf Eis aufgetaut, mit 5 µl Ligationsansatz (2.10.1.8) versetzt und vorsichtig gemischt. Nach mindestens 30-minütiger Inkubation auf Eis erfolgte das Einbringen der rekombinanten Plasmid-DNA in die Zellen mittels eines Hitzeschocks bei 42 °C für 45 s im Wasserbad. Direkt danach wurde der Ansatz für mindestens 2 min auf Eis gekühlt. Anschließend wurden 250 µl

vorgewärmtes SOC-Medium hinzugefügt und für mindestens 60 min bei 37 °C und 300 rpm inkubiert. 150 µl des Transformationsansatzes wurden nachfolgend auf ampicillinhaltige Selektions-Agarplatten ausgestrichen und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Somit konnten nur *E. coli*-Zellen wachsen, die erfolgreich mit dem Vektor transformiert wurden und folglich eine Ampicillinresistenz trugen.

SOC-Medium:

2 % Caseinhydrolysat
1 % Hefeextrakt
2,5 mM KCl
10 mM MgCl₂
10 mM MgSO₄
10 mM NaCl
20 mM Glukose

Medium vor Zugabe der Glukose mit 5 N NaOH auf pH 7,0 einstellen und autoklavieren.

Selektions-Agarplatten:

LB-Flüssigmedium mit Zusatz von: 1,5 % Agar (Sigma A-5054)
100 µg/ml Ampicillin

Medium mit 1 N NaOH auf pH 7,4 einstellen, 100 µg/ml Ampicillin nach Abkühlung des autoklavierten Ansatzes auf 50 °C zusetzen.

2.10.1.11 Mini-Präparation von Plasmid-DNA

Die Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterienzellen mit dem NucleoSpin Plus-Kit der Fa. Macherey-Nagel basiert im wesentlichen auf der Methode der alkalischen Lyse (BIRNBOIM und DOLY, 1979), jedoch werden Reinheit und Ausbeute der Präparation durch die zusätzliche Zentrifugation über eine Silikamembran erhöht.

Von 6-8 verschiedenen Klonen, die in der Kolonie-PCR (2.10.1.5) insertierte DNA der erwarteten Größe aufwiesen, wurde eine 3 ml Übernachtskultur mit ampicillinhaltigem LB-Selektionsmedium angesetzt. 2 ml der so gewonnenen Bakteriensuspension wurden für 30 s bei $12.000 \times g$ abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das verbliebene Zellsediment mit 250 µl RNase A-haltigem Puffer A1 resuspendiert. Die Lyse der Bakterienzellen erfolgte durch Zugabe von 250 µl alkalischem, SDS-haltigem Puffer A2 und anschließender 5-minütiger Inkubation unter leichtem Schütteln bei RT. Im nächsten Schritt wurden Zelltrümmer, bakterielle Proteine und genomische DNA, die nachfolgende Reaktionen stören könnten, durch Zugabe von 300 µl Puffer A3 gefällt und durch eine 10-minütige Zentrifugation bei $12.000 \times g$ und 4 °C abgetrennt. Der Überstand wurde auf eine NucleoSpin-Säule geladen und die enthaltenen Plasmide durch Zentrifugation ($12.000 \times g$, 1 min) an die Säulenmembran gebunden; der

Durchfluss wurde verworfen. Zur Inaktivierung möglicherweise noch aktiver bakterieller Nukleasen wurde die Silikamembran einmal mit 500 µl vorgewärmtem Puffer AW (50 °C) und anschließend zur Entfernung von Rückständen noch zweimal mit 600 µl ethanolhaltigem Puffer A4 gewaschen. Auf der Säule verbliebene, die weitere Bearbeitung der DNA eventuell störende, ethanolische Rückstände wurden durch 3-minütige Zentrifugation quantitativ entfernt. Die Elution der Plasmid-DNA erfolgte durch Inkubation der Säule mit 50 µl vorgewärmtem ddH₂O (70 °C) für 2 min bei RT und abschließender Zentrifugation (12.000 × g, 1 min).

2.10.1.12 Sequenzierung von DNA

Für die Identifizierung der Nukleotidsequenz von DNA-Fragmenten wurde eine weiterentwickelte Form des enzymatischen Kettenabbruchverfahrens von SANGER *et al.* (1977) genutzt. Dabei wird das DNA-Fragment durch Anlagerung eines einzelnen komplementären Primers linear amplifiziert. Bei diesem sogenannten '*cycle sequencing*'-Verfahren sind nur geringe Mengen einzel- oder doppelsträngiger DNA für die Aufklärung der DNA-Sequenz notwendig. Die Amplifikation erfolgt dabei wie bei einer PCR durch die temperaturabhängige Anlagerung des Primers und dessen Verlängerung nach Denaturierung der Zielsequenz. Zusätzlich zu den für die Neusynthese verwendeten Desoxynukleosidtriphosphaten (dNTPs) werden dem Reaktionsansatz in einem bestimmten Verhältnis Didesoxynukleosidtriphosphate (ddNTPs) hinzugefügt. Ein Einbau der ddNTPs in einen neu entstehenden Strang während der Extension führt wegen der fehlenden 3'-OH-Gruppe zum Abbruch der Kettenreaktion, woraus eine Akkumulierung spezifischer Abbruchprodukte im Reaktionsansatz im Verlauf der Zyklen resultiert. Zur Markierung der Abbruchprodukte sind die vier ddNTPs mit Farbstoffen verschiedener Fluoreszenzspektren markiert. Dadurch wird die parallele automatisierte Erkennung der spezifischen Produkte während der elektrophoretischen Trennung der unterschiedlich großen DNA-Fragmente in der Kapillarelektrophorese ermöglicht.

Die Sequenzierreaktion wurde unter Verwendung des PRISM BigDye Terminator Sequencing Kits (Applied Biosystems) nach Anweisung des Herstellers mit der entsprechend präparierten Plasmid-DNA durchgeführt.

Einfacher Reaktionsansatz für die Sequenzierreaktion:

4 µl BigDye Terminator Ready Reaction Mix
1 µl Oligonukleotidprimer (10 pmol/µl)
x µl Matrizen-DNA (DNA in ng = Basenpaaranzahl/7,5)
ad 20 µl ddH₂O

Die Amplifikation der Zielsequenz erfolgte mit folgendem Temperaturprogramm:

1. Denaturierung	96 °C	10 s	
2. Oligonukleotidanlagerung	50-60 °C	5 s	
3. Elongation (Verlängerung)	60 °C	4 min	25 Zyklen
4. Reaktionsende	4 °C	∞	

2.10.1.13 Aufreinigung von Sequenzierproben durch DNA-Präzipitation

Nach Ablauf des Temperaturprogrammes wurden die Reaktionsansätze mit je 80 µl ddH₂O verdünnt und in Eppendorfgefäße überführt. Die Fällung der DNA erfolgte durch Zugabe von 15 µl 2 M Natriumacetatlösung (pH 5,2) und 250 µl 95%igem Ethanol mit einer anschließenden Inkubation auf Eis für 10 min. Nachfolgend wurde die DNA durch Zentrifugation bei 15.000 rpm über 15 min sedimentiert und der Überstand vorsichtig abgesaugt. Der DNA-Niederschlag wurde mit 250 µl 70%igem Ethanol gewaschen (5 min, 15.000 rpm) und danach einige Minuten im Vakuum getrocknet, um das Ethanol quantitativ zu entfernen. Das Resuspendieren des Pellets erfolgte mit 25 µl ddH₂O. Dieser Ansatz wurde zur Sequenzierung im PRISM 310 Genetic Analyzer (ABI) über 30 s auf das Kapillargel aufgetragen und bei einer Spannung von 15 kV und einer Temperatur von 50 °C elektrophoretisch getrennt. Die Auswertung der aufgenommenen Fluoreszenzsignale erfolgte vollautomatisch durch die Sequence Analysis V3.4.1-Software (ABI).

2.10.2 *In vitro* Translation von hBD17

Zur *in vitro* Translation von hBD17 wurde das '*Coupled Rabbit Reticulocyte TNT System*' (Promega) eingesetzt. Die *in vitro* translatierten Produkte wurden mit ³⁵S-Cystein markiert. Als DNA-Matrize diente der Vektor pCR2.1-TOPO bzw. pcDNA3.1 (beide Invitrogen), in den der gesamte Offene Leserahmen des für hBD17 kodierenden Gens insertiert worden war. Die Bildung der mRNA erfolgte durch T7-Phagen-Polymerase, ausgehend vom spezifischen Promotor auf dem Vektor. Transkription und Translation finden in diesem System im selben Reaktionsgefäß statt.

2.10.2.1 Bildung eines transkriptions- und translationsaktiven Komplexes

Die Komponenten des Systems wurden bei -70 °C gelagert, kurz vor der Anwendung aufgetaut und anschließend sofort auf Eis gestellt. Die Puffer und Aminosäurelösungen wurden gut gemischt, um etwaige Präzipitate aufzulösen. Das Lysat wurde vorsichtig unter langsamer Bewegung der Pipettenspitze zum Ansatz pipettiert.

Reaktionsansatz für die *in vitro* Translation:

25 µl	Retikulozytenlysat
2 µl	Reaktionspuffer
1 µl	RNA-Polymerase
1 µl	Aminosäuren-Mix (ohne Cystein)
1 µl	RNAsin (RNase Inhibitor)
15 µl	RNase freies Wasser
4 µl	³⁵ S-Cystein [10 µCi/µl]
1 µg	DNA-Template

Die Ansätze wurden vorsichtig mit der Pipettenspitze gemischt und für 90 min bei 30 °C im Wasserbad inkubiert (nach THOMPSON und VAN OOSBREE, 1992). Die Durchführung der Versuche fand im Isotopenlabor statt. Als Positivkontrolle wurde jeweils ein Ansatz mit 2 µl Luciferase-DNA [0,5 µg/µl] mitgeführt, die im System enthalten war. Als Negativkontrolle diente ein Ansatz ohne DNA-Matrize.

2.10.2.2 Visualisierung der *in vitro* translatierten Produkte

Ein Aliquot (5 µl) des Ansatzes wurde mit 5 µl 2x NuPAGE Sample Buffer und 1 µl 0,5 M DTT Lösung versetzt, 10 min bei 70 °C denaturiert und auf einem SDS-PAGE-Gel (s. 2.6.2) aufgetrennt. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel mit Coomassie gefärbt (s. 2.6.2) und mit einem Gelrockner (Typ VSG, Fa. Renner, Darmstadt) auf einer doppelten Schicht Whatman-Filterpapier für 6-8 Stunden getrocknet. Anschließend wurde das Gel auf einem Röntgenfilm für 5 bis 7 Tage exponiert. Der Film wurde, wie unter 2.6.3 beschrieben, entwickelt und fixiert.

Alternativ wurden die Proteine aus dem Gel auf eine PVDF-Membran geblottet, das Produkt mit dem entsprechenden monoklonalen Antikörper markiert und der Nachweis über die unter 2.6.3 beschriebene Luminiszenz-Reaktion durchgeführt.

2.10.2.3 Bestimmung der prozentualen Aufnahme der markierten Aminosäure

Den Translations-Reaktionen wurden jeweils 2 µl Aliquots entnommen und diese zu 98 µl 1 M NaOH/2 % H₂O₂ gegeben. Diese Ansätze wurden gut durchmischt und 10 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde das translatierte Produkt mit 900 µl eiskalter TCA (25 %) gefällt und die Proben wurden 30 min auf Eis gestellt. Dann wurden 250 µl und 5 µl von jedem Ansatz auf zwei Whatman GF/C Glasfaserfilter gegeben und die Filter bei Raumtemperatur getrocknet. Die mit 250 µl Probe beschickten, trockenen Filter wurden einmal mit eiskalter 25%iger TCA,

dreimal mit eiskalter 5%iger TCA und abschließend mit Aceton gewaschen und bei RT getrocknet. Alle Filter wurden mit jeweils 3 ml Szintillationsflüssigkeit überschichtet, durch Schwenken gemischt und im Szintillationszähler (Modell 2500TA, Fa. Packard Instrument Company) gemessen.

Die prozentuale Aufnahme wurde nach folgender Formel bestimmt:

$$\frac{\text{'counts per minute' (cpm) des gewaschenen Filters}}{\text{cpm des ungewaschenen Filters} \times 50} \times 100 = \text{prozentuale Aufnahme}$$

Die Anregung über das Hintergrundniveau wurde wie folgt berechnet:

$$\frac{\text{cpm des gewaschenen Filters}}{\text{cpm der Negativkontrolle}} \times 100 = \text{x-fache Anregung}$$

2.10.3 Genutzte Datenbanken und Software

Die Entwicklung von Primern, das Entwerfen von Restriktionskarten und die Planung von Klonierungen erfolgten mit dem Computerprogramm Vector NTI 2.01 (InforMax, Oxford, U.K.). Sequenzvergleiche wurden mit dem AlignX-Unterprogramm durchgeführt. Die Suche nach öffentlich zugänglicher Sequenzinformation in Internetdatenbanken erfolgte auf dem ExPASy-Server bzw. dem NCBI-Server und dessen BLAST-Algorithmus (*'Basic Local Alignment Search Tool'*, ALTSCHUL *et al.*, 1997).

ExPASy (*'Expert Protein Analysis System'*, <http://www.expasy.ch>) ist ein Server des schweizerischen Instituts für Bioinformatik. Proteinsequenzen konnten hinsichtlich des Molekulargewichts, des isoelektrischen Punktes, der Hydrophobizität, der Sekundärstruktur usw. anhand der Datenbank auf diesem Server analysiert werden.

Die öffentliche Datenbank NCBI (*'National Center for Biotechnology Information'*, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) bietet ein breites Spektrum an Suchprogrammen zur Bewältigung der Datenfülle aller bekannten DNA-Sequenzen unterschiedlicher Spezies und der schnell wachsenden Menge der Literatur im Bereich der Medizin und Biologie. Diese Datenbank wurde für den Vergleich von Sequenzen mit den bis jetzt bekannten Genomen und deren mRNA-Produkten eingesetzt (BLAST) und bietet dazu ein vielfältiges Angebot zur Analyse von DNA-Sequenzen (GenBank).

Die densitometrische Auswertung der in Western Blot-Analysen erhaltenen spezifischen Protein-Signale (2.6.3) erfolgte mit Hilfe des Programms QuantiScan (Fa. Biosoft, Cambridge, England).

3 Ergebnisse

In bereits von RODRÍGUEZ JIMÉNEZ *et al.* (2003) durchgeführten Expressionsstudien konnte unter Anwendung quantitativer Echtzeit-RT-PCR (*Taqman*-Analyse) die Expression des *DEFB23*-Gens, das für hBD17 kodiert, in 5 von 28 verschiedenen humanen Geweben in unterschiedlicher Stärke nachgewiesen werden. Die bei weitem größte Anzahl von *DEFB23*-Transkripten wurde im männlichen Genitaltrakt detektiert (RODRÍGUEZ JIMÉNEZ *et al.*, 2003). In einem zellfreien System (*in vitro* Transkription/Translation, s. 3.1) sollte hBD17 dargestellt und durch den Einbau radioaktiv markierter Aminosäuren nachgewiesen werden. Zeitgleich erfolgte die Produktion spezifischer monoklonaler Antikörper (MAK) gegen hBD17, die zur immunhistochemischen Lokalisation des Zielpeptids in der Epididymis und zum Auffinden immunologischer Aktivitäten in den Peptidbanken eingesetzt wurden. Aufgrund der aus den genannten Expressionsanalysen gewonnenen Erkenntnisse und der im Verlauf der vorliegenden Dissertation durchgeführten immunhistochemischen Untersuchungen erschien eine Expression von hBD17 in humanem Sperma sehr wahrscheinlich. Daher wurde mit Hilfe spezifischer Antikörper versucht, dieses Peptid durch die sukzessive Aufreinigung immunologisch aktiver Fraktionen der entsprechenden Peptidbanken zu isolieren.

3.1 *In vitro* Transkription/Translation

Zunächst sollte gezeigt werden, daß die von der hBD17-cDNA transkribierte RNA tatsächlich für ein Protein kodiert und translatiert wird. Die Synthese des Proteins sollte *in vitro* mittels gekoppelter Transkription/Translation in Retikulozyten-Lysaten erfolgen (s. 2.10.2). Der Nachweis der Syntheseprodukte wurde durch Autoradiographie geführt. Dazu wurden dem Ansatz radioaktiv markierte Aminosäuren beigelegt (s. 2.10.2.2). Nach der gelungenen Herstellung von spezifischen Antikörpern sollten die synthetisierten Proteine auch durch die Antikörperbindung visualisiert werden.

3.1.1 Amplifizierung der für hBD17 kodierenden cDNA

Zur Amplifikation der für hBD17 kodierenden cDNA wurde unter Einsatz der als hBD17f und hBD17r bezeichneten Oligonukleotide eine PCR durchgeführt. Als Matrize diente hier cDNA, die im Rahmen einer Erststrangsynthese aus humanem Hoden gewonnen wurde. Die 6 DNA-Fragmente mit den deutlichsten Banden in der erwarteten Größe von etwa 270 Bp wurden in den

Expressionsvektor pCR2.1-TOPO kloniert. Dieser enthält auf der 5'-Seite der Klonierungsstellen eine T7-Promotorsequenz und konnte deshalb für die Transkription durch eine T7-Polymerase eingesetzt werden. Das jeweilige erhaltene PCR-Produkt und der Vektor wurden durch das Enzym Topoisomerase I ligiert. Das entstandene Plasmid wurde in transformationskompetente XL10-Gold *E. coli*-Zellen eingebracht. Auf dem verwendeten antibiotikahaltigen Nährboden konnten nur resistente Zellen Kolonien bilden, das heißt Zellen, die ein zirkuläres Plasmid mit dem Resistenzgen trugen. Mit den gewachsenen Zellkolonien wurde eine Kolonie-PCR (s. 2.10.1.5) durchgeführt. So sollten die Klone entdeckt werden, die insertierte DNA in der erwarteten Länge aufwiesen. Dieses war bei 6 Klonen der Fall (Abbildung 5).

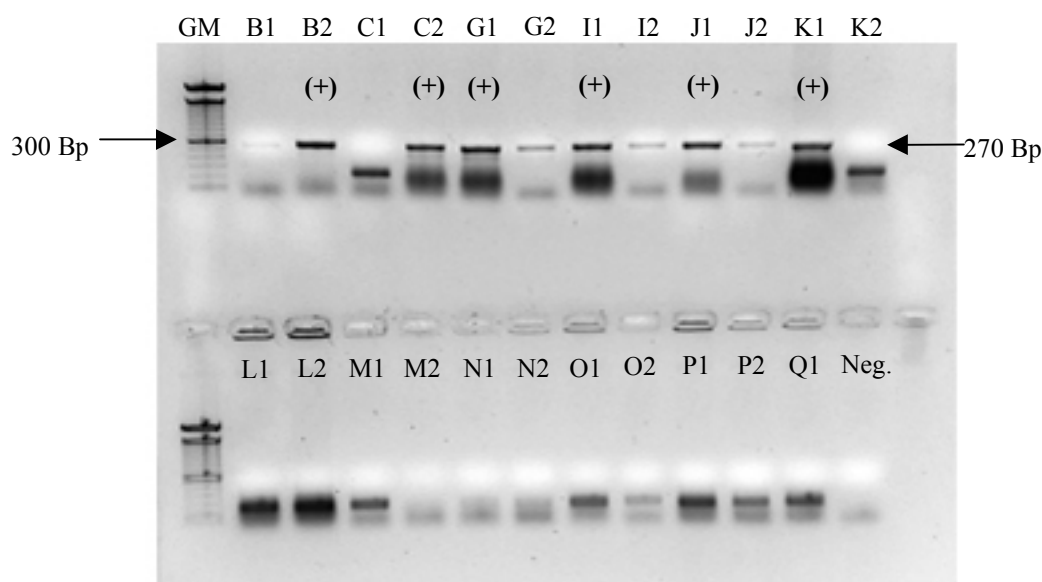


Abbildung 5: Resultate der Kolonie-PCR. Die PCR-Produkte wurden auf ein 2%iges Agarosegel geladen und bei 120 V elektrophoretisch getrennt. Als B1 bis Q1 sind die jeweiligen Einzelklone (EK) bezeichnet, die mit dem generierten Plasmid transfiziert wurden. In den jeweils linken Spuren wurde eine 50-Basenpaar-Leiter (Life Technologies) als Größenstandard aufgetragen (GM). Als Negativkontrolle wurde ein Ansatz ohne DNA-Matrize mitgeführt (Neg.). Die EK mit einem eindeutigen Signal in der erwarteten Höhe von 270 Basenpaaren (Bp) sind mit (+) gekennzeichnet. Diese wurden zur weiteren Bearbeitung ausgewählt.

Mit diesen 6 Klonen wurden Flüssigkulturen angeimpft, die der Präparation von Plasmid-DNA dienten (s. 2.10.1.11). Die so gewonnenen DNA-Fragmente wurden mit mehreren verschiedenen Primern sequenziert. Der als K1 bezeichnete Einzelklon trug den Expressionsvektor mit dem richtig orientiert insertierten DNA-Fragment, das die Wildtypsequenz aufwies. In Abbildung 6 ist die Sequenz des DNA-Fragments mit den Restriktionsschnittstellen dargestellt. Das reife Peptid besteht aus 48 Aminosäuren.

Sequenz von Klon K1 (einkloniert in pCR2.1-Vektor)
487 Basenpaare

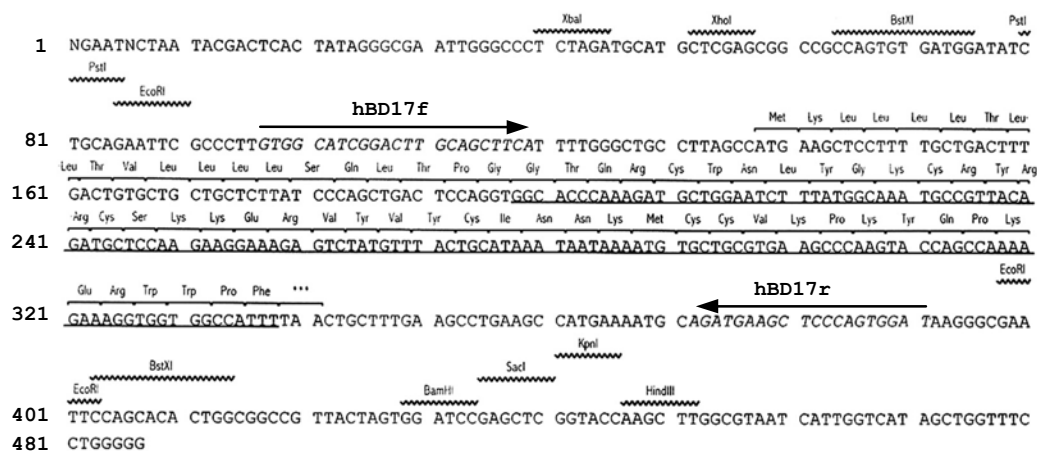


Abbildung 6: Sequenz der für hBD17 kodierenden DNA. Angegeben sind die Restriktionsschnittstellen (XbaI bis HindIII) und die Sequenzen der eingesetzten Primer hBD17f und hBD17r (kursiv). Die Aminosäuresequenz ist für das gesamte Peptid dargestellt, die Sequenz des reifen Peptids (ohne Signalpeptid) ist unterstrichen.

3.1.2 *In vitro* Translation eines Kontrollpeptids

Der Klon K1 wurde für die anschließende Transkription/Translation mit dem '*TNT T7 Coupled Reticulocyte Lysate*'-System (Promega) verwendet. Die Visualisierung der Resultate erfolgte mittels Autoradiographie. Die im System enthaltene Positivkontrolle verursachte eine deutliche Bande in der erwarteten Größe. Dies war auch bei einem eingesetzten Kontrollplasmid der Fall. Eine Expression des Zielpeptids konnte jedoch weder mit dem linearisierten, noch mit dem zirkulären Plasmid aus Klon K1 nachgewiesen werden (Abbildung 7).

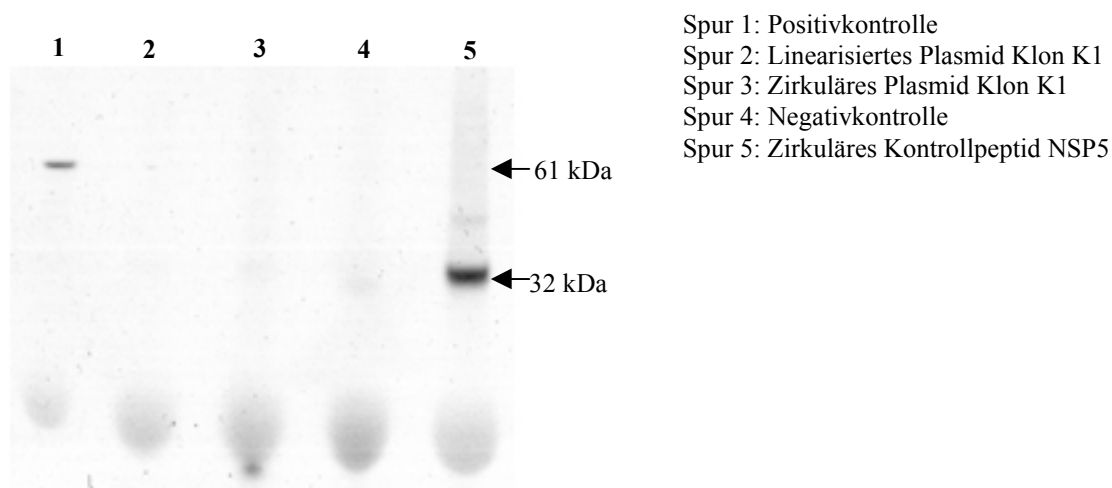


Abbildung 7: Autoradiographie der Produkte der *in vitro* Translation nach elektrophoretischer Trennung in einem 12%igen Bis-Tris-Gel. Als Positivkontrolle diente Luciferase (61 kDa). Ein Ansatz ohne DNA-Matrize fungierte als Negativkontrolle. Zusätzlich wurde ein zirkuläres Kontrollpeptid mitgeführt (32 kDa). Eine Expression des Zielpeptids konnte nicht nachgewiesen werden.

Als möglicher Grund schien eine Interferenz durch ein dem Offenen Leserahmen vorgelagertes, zusätzliches Startcodon (ATG) wahrscheinlich. Um diese ausschließen zu können, wurde versucht, das entsprechende DNA-Fragment in den Expressionsvektor pcDNA3.1 zu transferieren. Dieses gelang trotz mehrerer Ansätze mit diversen Restriktionsenzymen nicht (nicht gezeigt).

3.1.3 Entfernung des die Expression vermutlich behindernden Startcodons

Eine neue Strategie wurde mit der Entfernung des entsprechenden ATG-Codons und der anschließenden Religation des pCR2.1-TOPO-Vektors verfolgt. Dieses gelang durch einen Restriktionsverdau mit den Enzymen XbaI und XhoI und einem folgenden Auffüllen der klebrigen Schnittenden (*'sticky ends'*) mit dem Klenow-Fragment zu glatten Enden (*'blunt ends'*). Das zirkuläre Plasmid lag in gespanntem (*'tensed'*) und superspiralisiertem (*'supercoiled'*) Zustand vor und verursachte deshalb zwei Banden im Agarosegel. Nach dem gelungenen Verdau sollte sich die Bande des um 36 Basenpaare kleineren, doppelt geschnittenen Vektors fast auf derselben Höhe wie die Bande des *'tensed'*-Plasmids befinden. Der Vergleich des Laufverhaltens mit dem des ungeschnittenen Vektors zeigte nahezu identisch hohe Banden (Abbildung 8). Der Doppelverdau war hier also augenscheinlich erfolgreich. Der doppelt geschnittene Vektor wurde nach dem Generieren von glatten Enden durch eine DNA-Ligase wieder zur zirkulären Form zusammengefügt (religiert).

Das so entstandene Plasmid wurde in '*DH5 alpha Competent Cells*' (Invitrogen) transformiert. Die anschließende Kultivierung der entsprechenden Zellen erfolgte auf Selektionsnährböden. Durch den quantitativen Vergleich der Menge an eingesetzter Kontroll-DNA mit der Anzahl der gebildeten Bakterienkolonien konnte die Effizienz der Transformation bestimmt werden. Diese betrug $2,3 \times 10^8$, was den Angaben des Herstellers der kompetenten Zellen entsprach. Mit 16 ausgewählten Kolonien wurden Flüssigkulturen angeimpft und eine Kolonie-PCR (2.10.1.5) durchgeführt. Bei allen 16 Klonen war eine Bande in der erwarteten Größe von 270 Bp zu erkennen (nicht gezeigt). Aus den Flüssigkulturen acht ausgewählter Klone wurde die Plasmid-DNA präpariert. Ein erfolgreiches Entfernen des Vektorfragments, welches das zusätzliche ATG-Codon trug, hätte auch eine Deletion der XhoI- und XbaI-Restriktionsschnittstellen zur Folge gehabt. Die Vektoren der acht Klone wurden demzufolge einem Restriktionsverdau mit A) dem Restriktionsenzym XhoI und B) dem Restriktionsenzym XbaI unterzogen. Der Vergleich des Laufverhaltens im Agarosegel mit dem verdauten und nicht verdauten Originalvektor zeigte, daß fünf der acht Plasmide die entsprechenden Schnittstellen nicht mehr trugen (Abbildung 9). Die Basenabfolge dieser Vektoren wurde durch eine Sequenzanalyse (2.10.1.12) bestimmt. Das aus dem als B1 bezeichneten Einzelklon präparierte Plasmid trug die für hBD17 kodierende Wildtypsequenz, wobei das entsprechende ATG-Codon erfolgreich eliminiert worden war. In Abbildung 10 sind die Modelle und Sequenzen der insertierten DNA-Fragmente der Klone K2 und B1 dargestellt.

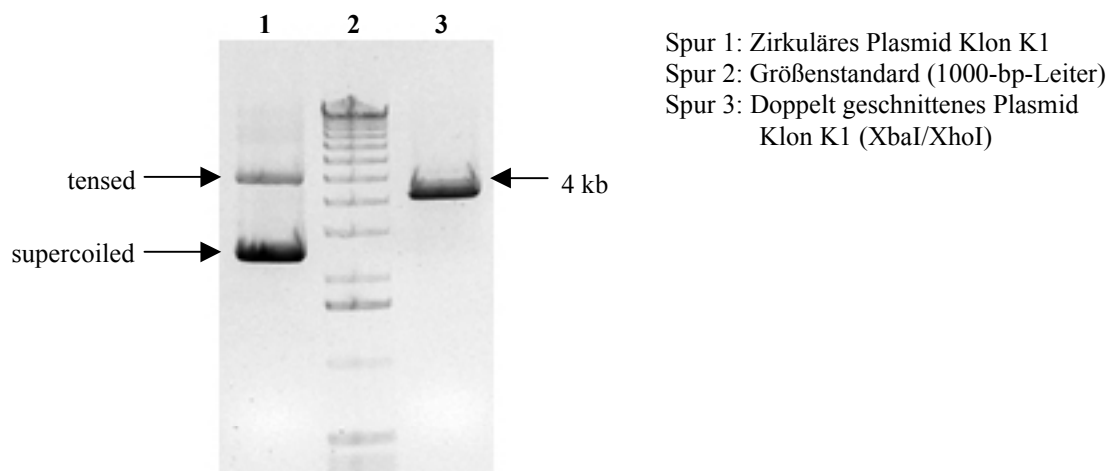


Abbildung 8: Produkt des Doppelverdaus vom pCR2.1-Vektor des Klons K1 (Spur 3) mit den Restriktionsenzymen XbaI und XhoI. Als Kontrolle wurde der ungeschnittene Vektor aufgetragen (Spur 1). Dieser lag in gespanntem (*'tensed'*) und superspiralisiertem (*'supercoiled'*) Zustand vor. Aus dem schnelleren Laufverhalten des superspiralisierten Plasmids im Agarosegel (0,9 %) resultierten zwei Banden. Die Höhe der Bande des doppelt geschnittenen Vektors unterschied sich erwartungsgemäß nur geringfügig von der des gespannten Vektors. Als Größenstandard (Spur 2) diente die 1000-Basenpaar-Leiter (Life Technologies).

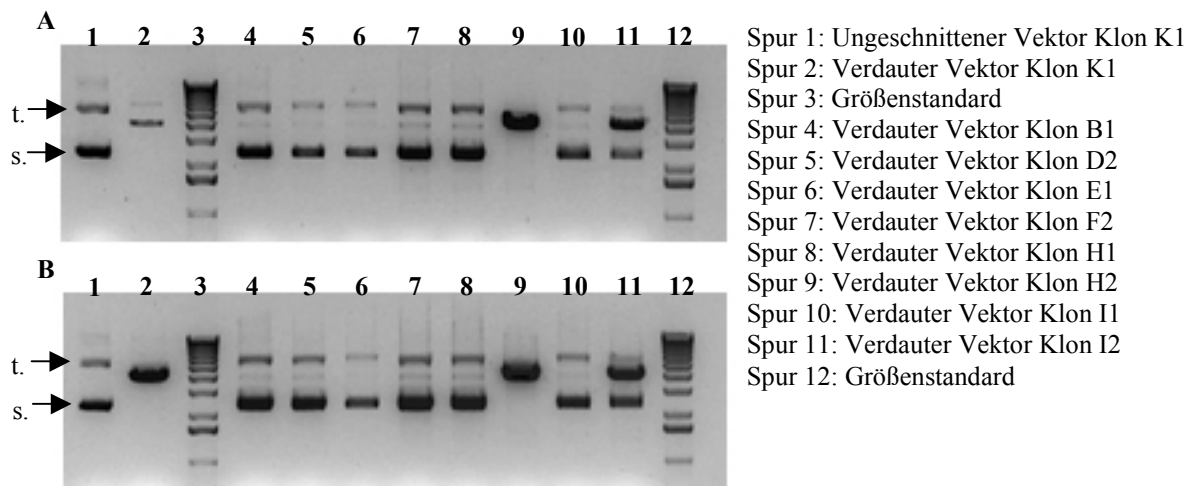


Abbildung 9: Ergebnisse des XhoI (A)- bzw. XbaI (B)-Restriktionsverdaus der Minipräparationen der Vektoren ausgewählter Klone. Ziel des Verdaus war es, ein dem ORF vorgelagertes Startcodon zu entfernen. Mit der erfolgreich entfernten Sequenz wurden auch die Restriktionsschnittstellen für XhoI und XbaI deletiert. Die Klone B1 bis H1 zeigen im Agarosegel (0,9 %) ein nahezu identisches Laufverhalten wie der ungeschnittene Ursprungsvektor. Diese Plasmide liegen demzufolge nach dem Verdau in zirkulärer Form vor, was sich in den typischen Banden für den *'tensed'* (t.) und *'supercoiled'* (s.) Zustand äußert. Diese Klone sollten das betreffende Startcodon nicht mehr tragen. Als Größenstandard wurde eine 1000-Basenpaar-Leiter (Life Technologies) aufgetragen.

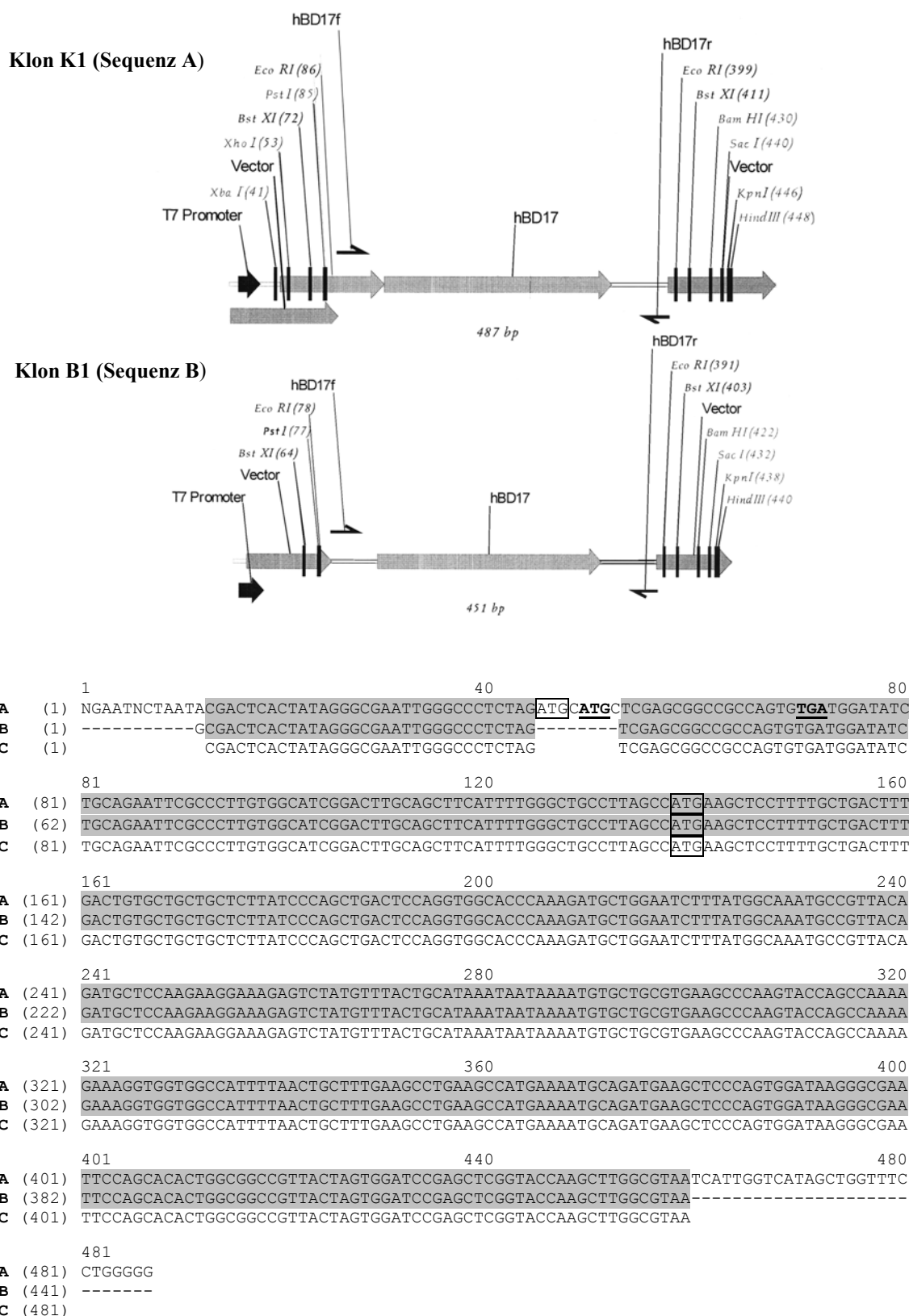


Abbildung 10: Oben: Modell des für hBD17 kodierenden DNA-Abschnitts im pCR2.1-Vektor mit den vor- und nachgelegenen Restriktionsschnittstellen (XbaI bis HindIII) der Klone K1 und B1. Unten: Sequenzvergleich der Klone K1 (Sequenz A) und B1 (Sequenz B). Übereinstimmende Sequenzen sind grau unterlegt und unter Sequenz C angegeben. Das nicht innerhalb des Leserasters befindliche Start- (ATG) bzw. Stopcodon (TGA) ist unterstrichen, die im Leseraster gelegenen Startcodons sind umrandet.

3.1.4 Visualisierung der Resultate

Die Reaktionsprodukte wurden einer elektrophoretischen Trennung und nachfolgender Autoradiographie unterzogen. Die Positivkontrolle verursachte eine deutliche Bande. Bei dem Ansatz mit dem Vektor B1 war jedoch keine eindeutige, sich vom Hintergrund unterscheidende Bande zu erkennen (Abbildung 11). Da eine putative Bande eventuell von dem ausgeprägten Hintergrund im unteren Teil des Gels überdeckt worden sein könnte, wurde alternativ versucht, das *in vitro* translatierte Zielpeptid mit dem spezifischen Antikörper zu detektieren. Dazu wurden die gelelektrophoretisch getrennten Proteine auf eine PVDF-Membran geblottet; das weitere Verfahren erfolgte analog zum Immunoblotting (2.6.3). Es trat jedoch keine zusätzliche Bande im Vergleich zur Negativkontrolle (ohne DNA-Matrize) auf. In der erwarteten Größe von ca. 6 kDa waren sowohl im Ansatz der *in vitro* Reaktion, als auch in der Negativkontrolle keine Banden erkennbar (nicht gezeigt). Zur Kontrolle einer möglichen Veränderung des Bandenmusters auch im höhermolekularen Bereich wurde jeweils einem Aliquot des *in vitro* translatierten Reaktionsprodukts und der Negativkontrolle vor der elektrophoretischen Trennung 30 ng synthetisches hBD17 zugesetzt. Es kam weder zu einer Verschiebung des Bandenmusters noch zu einer Verstärkung oder Abschwächung einzelner Banden, abgesehen vom Auftreten der vom synthetischen Peptid hervorgerufenen Bande (Abbildung 12).

Da das Kontrollpeptid und die Positivkontrolle translatiert werden konnten, war die Umschreibung der entsprechenden DNA-Fragmente in mRNA offenbar erfolgreich. Die für hBD17, Kontrollpeptid und systeminterne Positivkontrolle kodierenden Vektoren trugen alle eine T7-Promoterregion, also sollte auch die Transkription des für hBD17 kodierenden DNA-Fragments stattgefunden haben. Dennoch konnte keine Translation von hBD17 nachgewiesen werden.

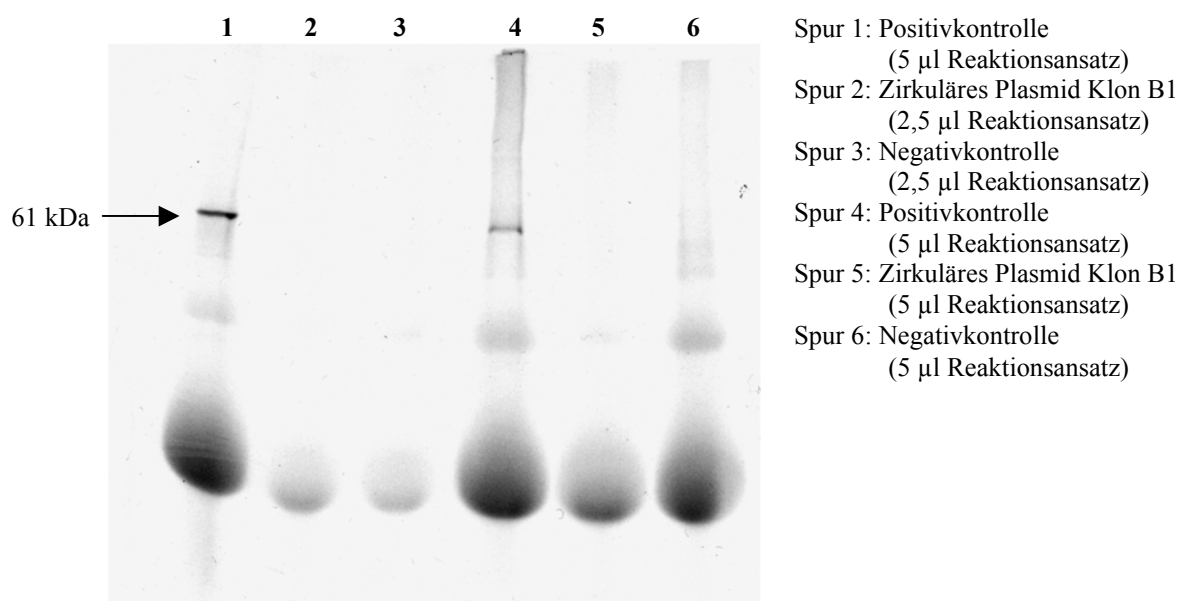


Abbildung 11: Autoradiographie der Produkte der *in vitro* Translation nach elektrophoretischer Trennung in einem 18%igen Tris-Glycin-Gel. Als Positivkontrolle diente Luciferase (61 kDa). Ein Ansatz ohne DNA-Matrize fungierte als Negativkontrolle. Eine Expression des Zielpeptids durch den Vektor aus Klon B1 konnte nicht nachgewiesen werden. Möglicherweise ist eine putative Bande vom ausgeprägten Hintergrund im unteren Drittel der Spuren überlagert.

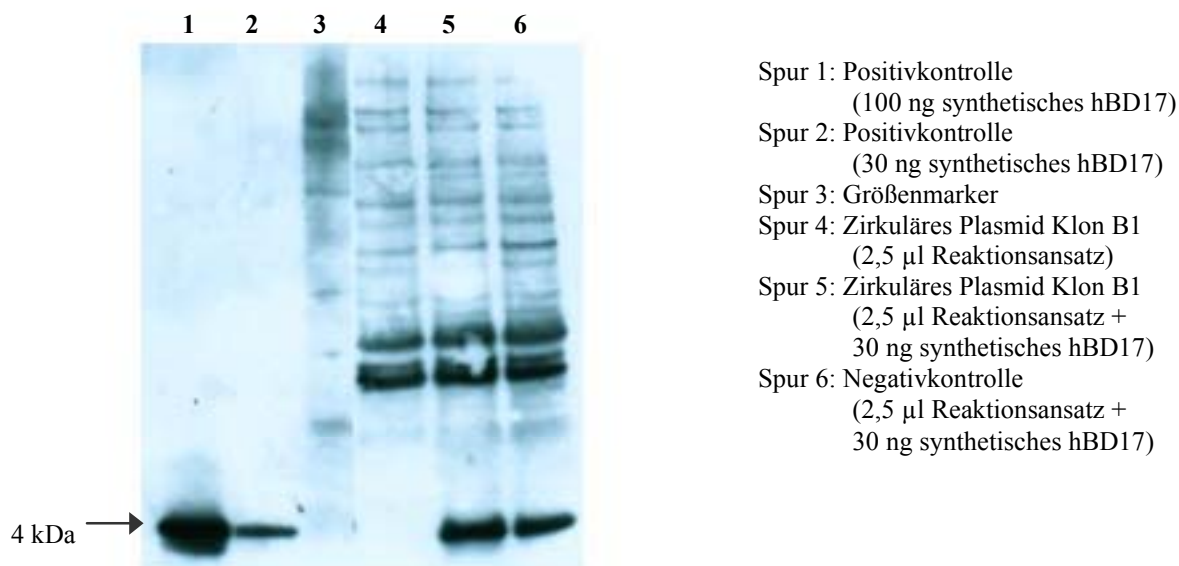


Abbildung 12: Immunoblot: Visualisierung der Produkte der *in vitro* Translation durch Antikörperbindung nach elektrophoretischer Trennung in einem 4-12%igen Bis-Tris-Gel. Als Positivkontrolle wurden 30 ng und 100 ng synthetisches hBD17 aufgetragen. Ein Ansatz ohne DNA-Matrize fungierte als Negativkontrolle. Um eine mögliche Veränderung des Bandenmusters erkennen zu können, wurde ein Aliquot des Reaktionsansatzes (Klon B1) und die Negativkontrolle mit jeweils 30 ng synthetischem hBD17 versetzt. Eine Expression des Zielpeptids durch den Vektor aus Klon B1 konnte nicht nachgewiesen werden.

3.2 Immunhistochemischer Nachweis von hBD17

Immunhistochemische Methoden stellen empfindliche Werkzeuge zur Detektion und Lokalisation von Proteinen in Zellen und Geweben dar. Der Erfolg der Methode hängt maßgeblich von der Spezifität und Sensitivität der an das antigene Protein bindenden Antikörper ab. Daher war im Vorfeld eine Charakterisierung der monoklonalen Antikörper (MAK) erforderlich, um eine ausreichende Sensitivität erreichen und Kreuzreaktivitäten weitgehend ausschließen zu können (s. 3.2.1). Zum Nachweis von hBD17 in humanem Nebenhoden wurden fixierte Gewebeschnitte verwendet. Die Visualisierung der Antikörperbindung erfolgte mit einem Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörper (2.9.2).

3.2.1 Untersuchungen zur Sensitivität und Spezifität der generierten monoklonalen Antikörper mit immunologischen Methoden

Aus der Immunisierung von Mäusen und der anschließenden Fusion und Kultivierung der Hybridomazellen (2.2.3) resultierten 52 verschiedene Einzelklone (EK), deren Zellkulturüberstände in der ELISA-Analyse (2.2.4) ein positives Signal verursachten und somit Antikörper enthielten. Für die weiteren Untersuchungen wurden die 15 EK mit dem stärksten Signal im ELISA, 3 EK mit einem mittleren Signal und 2 EK mit einem schwachen Signal ausgewählt. Diese wurden im Western Blot auf das Erkennen von jeweils 3 ng und 10 ng synthetischem hBD17 getestet (n=2). Die Resultate zeigen, daß ein ausgeprägtes Signal in der ELISA-Analyse nicht auf eine hohe Sensitivität des MAK im Western Blot schließen läßt (s. Tabelle 3). Die 6 Zellkulturüberstände mit den stärksten Signalen im Western Blot wurden mit einer Konzentrationsreihe von synthetischem hBD17 erneut auf Sensitivität getestet. Die beiden signalstärksten Antikörper L11-1b-C5 und L11-1b-H11 zeigten ein Detektionslimit von 5 ng bzw. 10 ng Zielpeptid/Spur (Abbildung 13). Experimente zur Spezifität dieser Antikörper ergaben, daß weder ein verwandtes Peptid aus der Defensingruppe (hBD30) noch Peptide ähnlichen Molekulargewichts (z.B. Corticotropin Releasing Factor (CRF), MG: 4.766 Da) im Immunoblot erkannt wurden (n=3).

Tabelle 3: Aufstellung der Signalstärken der antikörperhaltigen Zellkulturüberstände in der ELISA- und Western Blot-Analyse (n=2). Symbole: (– –) kein Signal, (–) schwaches Signal, (○) mittleres Signal, (+) starkes Signal, (++) sehr starkes Signal. Die ELISA-Signalwerte sind die Mittelwerte von 2 Messungen, die jeweils in Duplika vorgenommen wurden. In den Klammern ist die entsprechende Standardabweichung (+/-SD) angegeben.

Monoklonaler Antikörper	Signal im ELISA (+/-SD)	Signal im Western Blot
L9-11b-A5	1,93 (0,54)	(– –)
L9-11b-E1	1,76 (0,59)	(– –)
L1-1a-A5	1,74 (0,60)	(–)
L9-11b-E8	1,73 (0,60)	(○)
L1-1a-A6	1,70 (0,53)	(–)
L1-1a-E7	1,70 (0,57)	(+)
L11-1b-D10	1,70 (0,57)	(–)
L1-1a-E6	1,68 (0,58)	(○)
L11-1a-D5	1,64 (0,58)	(–)
L1-1b-B9	1,60 (0,69)	(+)
L11-1b-C5	1,55 (0,56)	(++)
L1-18a-C9	1,51 (0,77)	(–)
L1-1a-A1	1,51 (0,63)	(+)
L1-1a-E12	1,49 (0,66)	(+)
L11-1b-H11	1,46 (0,65)	(++)
L1-18a-E12	1,43 (0,45)	(+)
L1-18a-F6	1,24 (0,50)	(++)
L11-1a-C12	1,15 (0,71)	(– –)
L8-10b-H1	0,68 (0,21)	(– –)
M8-24a-E8	0,11 (0,02)	(– –)

Auffällig ist, daß die ausgewählten Antikörper gegenüber dem synthetischen Peptid in reduziertem Zustand eine wesentlich höhere Affinität zeigten als gegenüber dem nicht reduzierten synthetischen hBD17. Die Reduktion mit DTT bewirkt im Allgemeinen eine Spaltung der Disulfidbrücken und somit eine Änderung der gefalteten Konformation des Proteins (SIMONOVIC und PATSTON, 2000). Obwohl das hBD17-Peptid in linearer Form hergestellt wurde, weist die deutliche Diskrepanz zwischen den Nachweisgrenzen des reduzierten und des nicht reduzierten Zielpeptids mit denselben Antikörpern auf eine spontane Faltung des synthetisierten Peptids hin. Im Western Blot eingesetzte Proben wurden daher unter Zusatz von DTT reduziert (s. 2.6.1).

Spur 1: 1 ng synth. hBD17 reduziert	Spur 9: 30 ng synth. hBD17 nicht reduziert
Spur 2: 5 ng synth. hBD17 reduziert	Spur 10: 100 ng synth. hBD17 nicht reduziert
Spur 3: 10 ng synth. hBD17 reduziert	Spur 11: Größenmarker
Spur 4: 30 ng synth. hBD17 reduziert	Spur 12: 10 ng CRF nicht reduziert
Spur 5: 100 ng synth. hBD17 reduziert	Spur 13: 30 ng CRF nicht reduziert
Spur 6: 1 ng synth. hBD17 nicht reduziert	Spur 14: 10 ng CRF reduziert
Spur 7: 5 ng synth. hBD17 nicht reduziert	Spur 15: 30 ng CRF reduziert
Spur 8: 10 ng synth. hBD17 nicht reduziert	

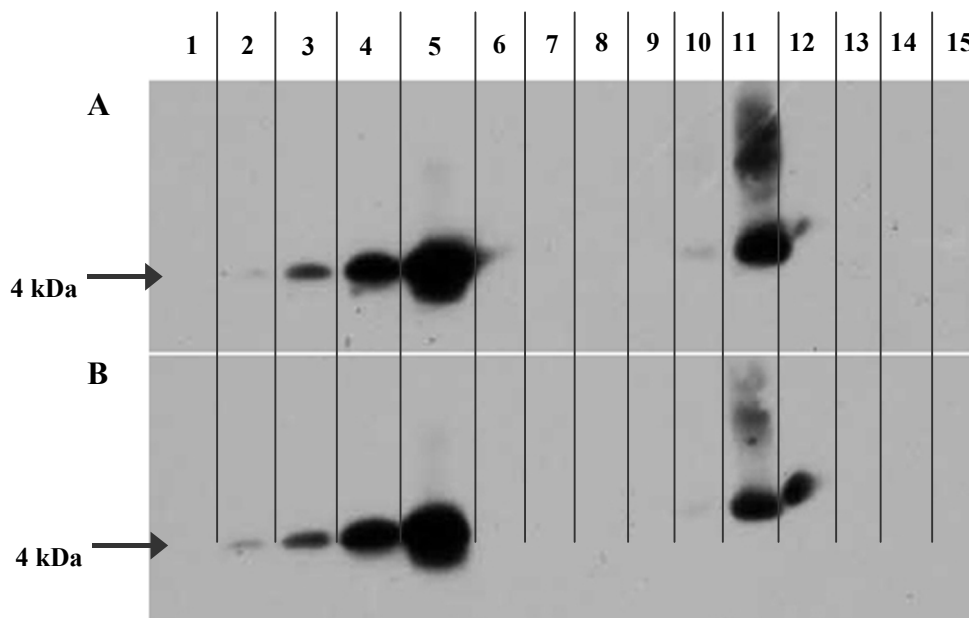


Abbildung 13: Test auf Sensitivität und Spezifität der monoklonalen Antikörper L11-1b-H11 (Blot A) und L11-1b-C5 (Blot B) im Immunoblot. Eingesetzt wurde jeweils eine Konzentrationsreihe von mit DTT reduziertem synthetischen hBD17 und nicht reduziertem hBD17. Die Antikörper erkannten 10 ng (A) bzw. 5 ng (B) reduziertes Peptid. Nicht reduziertes Peptid wurde erst ab einer Menge von 100 ng erkannt. CRF verursachte weder in reduzierter noch in nicht reduzierter Form ein Signal (n=2).

Parallel erfolgten Versuche zur Sensitivität der ausgewählten 20 Antikörper in der Dot Blot-Analyse (s. 2.3). Zunächst schien der MAK das Zielpeptid konzentrationsabhängig mit einem Detektionslimit von 3 ng zu erkennen (Abbildung 14, Blot A). Dieses Ergebnis ließ sich jedoch nicht reproduzieren. In weiteren Dot Blot-Analysen konnten mit dem synthetischen hBD17-Peptid keine reproduzierbaren, konzentrationsabhängigen Signale erzielt werden. In Abbildung 14, Blot B ist exemplarisch das Resultat der Dot Blot-Untersuchung für einen der 20 getesteten MAK dargestellt.

Versuche mit synthetischem hBD4 und gegen dieses Peptid gerichteten monoklonalen Antikörpern belegten eine gute Korrelation zwischen im Western Blot und in der Immunhistochemie erzielten Signalstärken (RODRIGUEZ-JIMENEZ, 2003). Zur immunhistologischen Detektion von hBD17 wurden deshalb zunächst die MAK L11-1b-C5 und L11-1b-H11 eingesetzt.

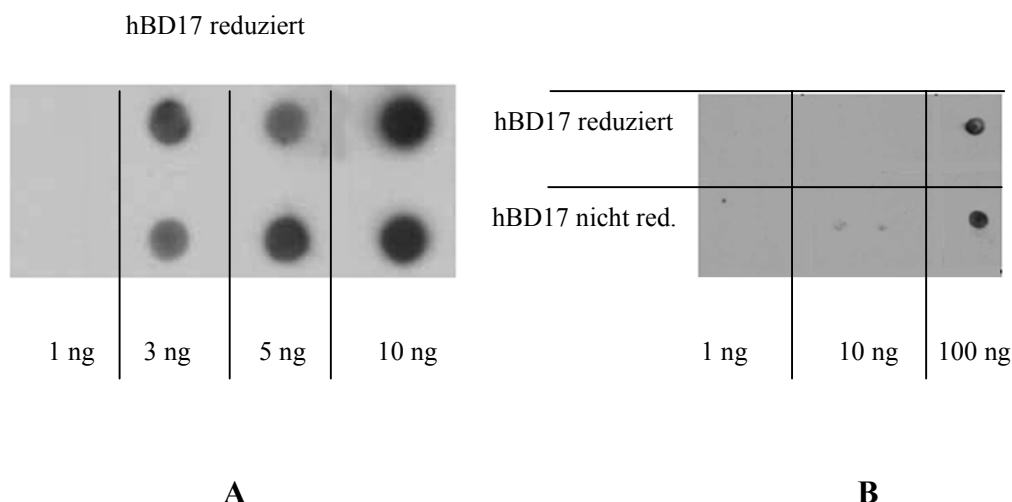


Abbildung 14: Dot Blots mit aufgetragenen Konzentrationsreihen des synthetischen hBD17-Peptids unter Verwendung des monoklonalen Antikörpers (MAK) L11-1b-C5 als Primärantikörper. Blot A: Konzentrationsreihe mit synthetischem, mit DTT reduziertem hBD17. Das Detektionslimit lag bei 3 ng. Dieses Ergebnis ließ sich nicht reproduzieren. Blot B: Der Antikörper erkannte reduziertes hBD17 erst ab einer Konzentration von 100 ng (n=4).

3.2.2 Verteilung von hBD17 in humanem Nebenhoden

Die Detektion des Zielpeptids erfolgte unter Verwendung der unverdünnten, antikörperhaltigen Zellkulturüberstände. Der MAK L11-1b-C5 verursachte eine deutlich stärkere Färbung als der MAK L11-1b-H11 (nicht gezeigt). In den weiteren immunhistochemischen Experimenten kam deshalb der MAK L11-1b-C5 zur Anwendung.

Zur besseren Übersicht ist in Abbildung 15 eine makroskopische Modellzeichnung des Nebenhodens mit den angesprochenen Abschnitten dargestellt. Eine spezifische Färbung zeigte sich im Verlauf der immunhistochemischen Detektion von hBD17 im *Caput epididymidis* (1) in den das Lumen des Nebenhodenganges (*Ductus epididymidis*) und die ausführenden Kanälchen des Hodens (*Ductuli efferentes*) auskleidenden Epithelzellen und (2) in der die Spermatozoen umgebenden Seminalflüssigkeit (Abbildung 16). Unter stärkerer Vergrößerung (480-fach) ließ sich die spezifische Färbung (1) den apikalen Strukturen der Epithelzellen und (2) Vesikeln, die zwischen Spermatozoen und Makrophagen in der Seminalflüssigkeit flottieren, zuordnen (Abbildung 17). Das Auftreten von nachweisbaren Konzentrationen von hBD17 ausschließlich im Kopfteil des humanen Nebenhodens steht mit den Ergebnissen vorangegangener Expressionsstudien in Einklang. In diesen Versuchen konnten hBD17-Transkripte mittels *Taqman*-Analyse vor allem im *Caput epididymidis* nachgewiesen werden. Im zentralen Teil (*Corpus epididymidis*) und im hinteren Teil (*Cauda epididymidis*) des Nebenhodens wurde das Zielpeptid in deutlich geringerem Umfang exprimiert (RODRIGUEZ-JIMENEZ, 2003).

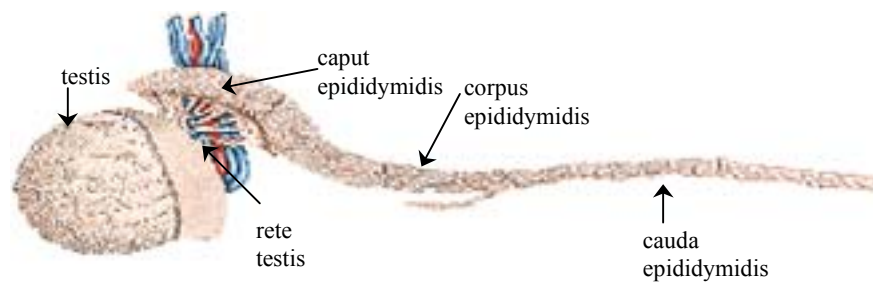


Abbildung 15: Makroskopische Übersichtszeichnung des humanen Nebenhodens und Hodens. Dargestellt sind die funktionellen Abschnitte von Epididymis und Hoden. Aus SOBOTTA (1988), modifiziert.

Zur Überprüfung der Empfindlichkeit der in den immunhistochemischen Experimenten aufgetretenen Färbung wurden Gewebeschnitte mit dem 1:5 verdünnten Zellkulturüberstand L11-1b-C5 inkubiert. Die resultierende Färbung der apikalen Strukturen der epithelialen Zellen war deutlich schwächer als die Färbung mit dem unverdünnten Überstand. Die unspezifische Hintergrundfärbung nahm in ihrer Intensität leicht ab. Die Anfärbung der Vesikel im Lumen der Kanäle fiel im Vergleich mit dem unverdünnten Zellkulturüberstand nur unwesentlich schwächer aus (Abbildung 18).

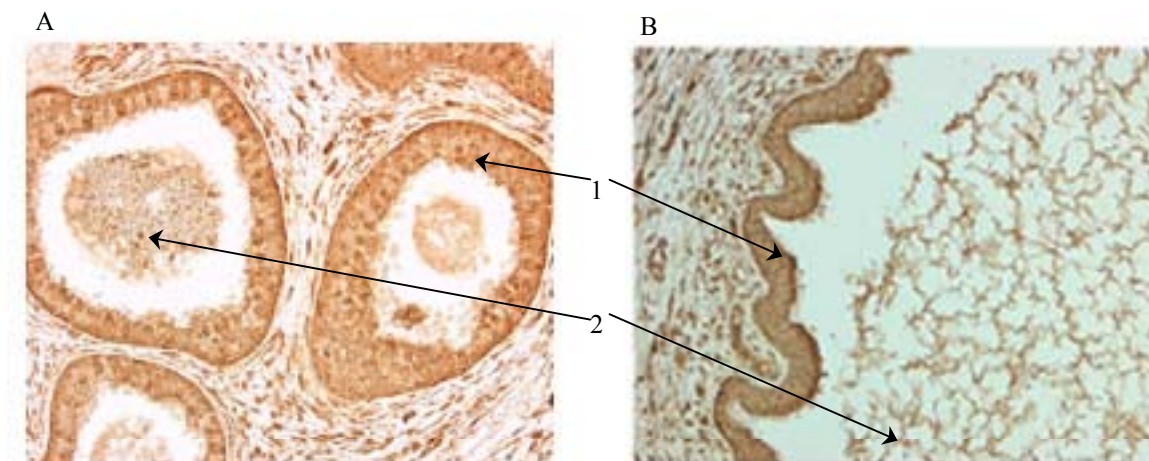


Abbildung 16: Immunologische Detektion von hBD17 im *Caput epididymidis*. Dargestellt sind transversale Schnitte durch den proximalen Abschnitt der Kopfregion des humanen Nebenhodens in (A) 32-facher und (B) 80-facher Vergrößerung. Zu erkennen sind von epithelialen Zellen ausgekleidete Kanäle, die von interstitiellem Gewebe umgeben sind und die im Lumen der Kanäle lokalisierten Spermatozoen. Die Visualisierung der Antikörperbindung erfolgte durch eine Peroxidase-Reaktion, die eine braune Färbung der entsprechenden Gewebeareale zur Folge hatte. Der den monoklonalen Antikörper L11-1b-C5 enthaltende Zellkulturüberstand wurde unverdünnt eingesetzt. Eine spezifische Färbung trat (1) in den Epithelzellen und (2) in der die Spermatozoen umgebenden Seminalflüssigkeit auf.

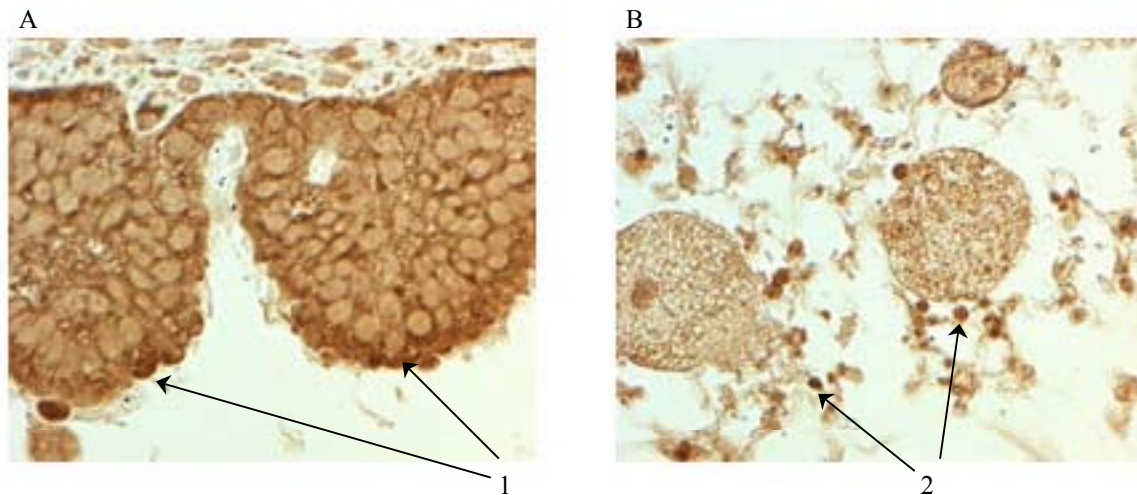


Abbildung 17: Immunologische Detektion von hBD17 im *Caput epididymidis*. Dargestellt sind Schnitte (A) durch das Epithel eines *Ductus efferens* und (B) durch das Lumen des *Ductus epididymidis* mit dem enthaltenen Seminalplasma und den Spermatozoen in 480-facher Vergrößerung. Die Visualisierung der Antikörperbindung erfolgte durch eine Peroxidase-Reaktion, die eine braune Färbung der entsprechenden Strukturen zur Folge hatte. Der den monoklonalen Antikörper L11-1b-C5 enthaltende Zellkulturüberstand wurde unverdünnt eingesetzt. Eine spezifische Färbung trat (1) im apikalen Teil der Epithelzellen und (2) in Vesikeln auf, die in der Seminalflüssigkeit zwischen Spermatozoen und Makrophagen lokalisiert waren.

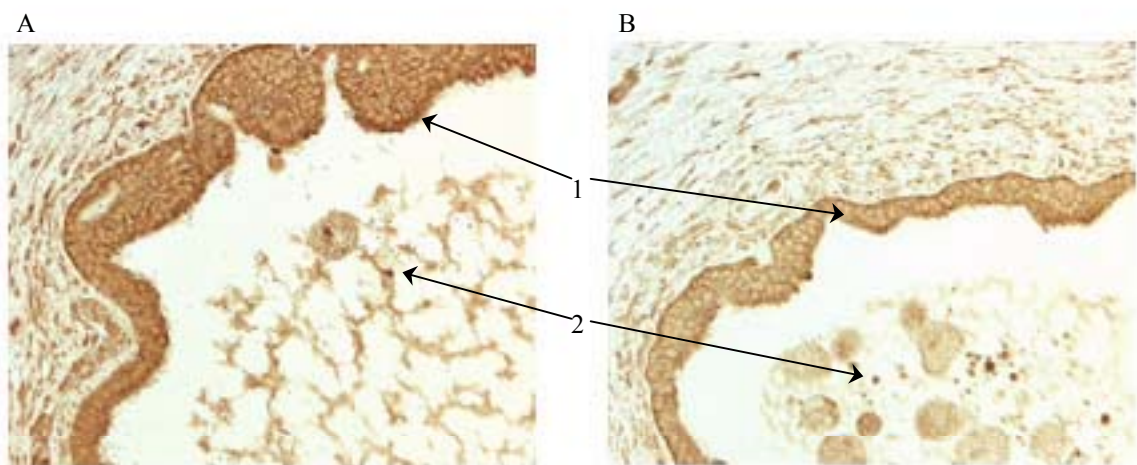


Abbildung 18: Immunologische Detektion von hBD17 im *Caput epididymidis*. Dargestellt sind transversale Schnitte durch den proximalen Abschnitt der Kopfregion des humanen Nebenhodens in 80-facher Vergrößerung. Zu erkennen sind von epithelialen Zellen ausgekleidete Kanäle mit den darin befindlichen Spermatozoen, die von interstitiellem Gewebe umgeben sind. Die Visualisierung der Antikörperbindung erfolgte durch eine Peroxidase-Reaktion, die eine braune Färbung der entsprechenden Gewebeareale zur Folge hatte. Der den monoklonalen Antikörper L11-1b-C5 enthaltende Zellkulturüberstand wurde (A) unverdünnt und (B) in einer 1:5-Verdünnung eingesetzt. Eine spezifische Färbung trat (1) im apikalen Teil der Epithelzellen und (2) in von Spermatozoen umgebenen Vesikeln auf.

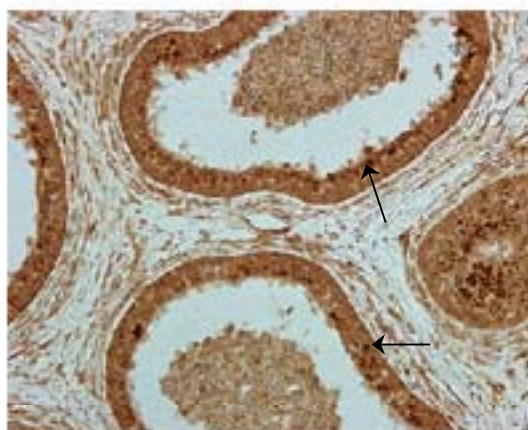


Abbildung 19: Immunologische Detektion von ET-1 im *Caput epididymidis*. Dargestellt ist ein transversaler Schnitt durch die Kopfregion des humanen Nebenhodens in 32-facher Vergrößerung. Zu erkennen sind von epithelialen Zellen ausgekleidete Kanäle, die von interstitiellem Gewebe umgeben sind und die im Lumen der Kanäle lokalisierten Spermatozoen. Die Visualisierung der Antikörperbindung erfolgte durch eine Peroxidase-Reaktion, die eine braune Färbung der entsprechenden Gewebeareale zur Folge hatte. Eine spezifische Färbung trat in den Epithelzellen auf (s. Pfeile).

Zur Beurteilung der Spezifität der immunhistochemischen Färbung sollte ein Peptid, dessen Existenz in dem betreffenden Gewebe bereits nachgewiesen wurde, in der gleichen Weise detektiert werden. PERI *et al.* (1997) konnten mit immunhistochemischen Methoden zeigen, daß Endothelin-1 (ET-1) in den Epithelzellen des Nebenhodenganges exprimiert wird. ET-1 diente deshalb in den Versuchen als Positivkontrolle. In Übereinstimmung mit den Resultaten von PERI *et al.* (1997) führte die Sichtbarmachung der Antikörperbindung an ET-1 zu einer spezifischen Färbung der Epithelzellen des *Ductus epididymidis* (Abbildung 19).

Durch den Einsatz von Negativkontrollen konnte eine aus der Antigendemaskierung resultierende, falsch positive Färbung (SHI *et al.* 1997) ausgeschlossen werden. Die Negativkontrollen ermöglichten auch eine Abschätzung des Verhältnisses von spezifischem Signal und Hintergrund. Dazu wurden Gewebeschnitte derselben Behandlung (Deparaffinisierung, Rehydrierung, Epitopdemaskierung) unterzogen wie die oben gezeigten Schnitte. Die Inkubation mit dem antikörperhaltigen Zellkulturüberstand wurde jedoch durch eine Inkubation mit dem entsprechenden Zellkulturmedium (OPTIMEM, Fa. Invitrogen, Groningen, NL) ersetzt.

Als zusätzliche Negativkontrolle zur Überprüfung der nicht spezifischen Bindung von monoklonalen Mausantikörpern in humanem Nebenhoden dienten Schnitte, die mit einem Isotyp IgG γ -1 Mausantikörper anstatt dem MAK L11-1b-C5 inkubiert wurden. Dieser Isotyp weist die

gleiche dreidimensionale Struktur wie der generierte MAK auf. Spezifische Strukturen zur Erkennung der antigenen Determinante sind bei dem Isotyp aber nicht ausgeprägt; er sollte das Zielpeptid im Gewebe des Nebenhodens also nicht erkennen. Bei beiden Negativkontrollen war weder in den Epithelzellen der Kanäle, noch in den Vesikeln in der Seminalflüssigkeit eine spezifische Färbung zu erkennen (Abbildung 20).

Die Resultate der durchgeführten Kontrollexperimente belegen eine Spezifität der erzielten immunhistochemischen Färbung in den Präparaten aus dem Kopfteil des humanen Nebenhodens. Das hBD17-Peptid konnte in den angesprochenen Gewebearealen (apikaler Teil der Epithelzellen, Vesikel im epididymalen Lumen) dargestellt werden.

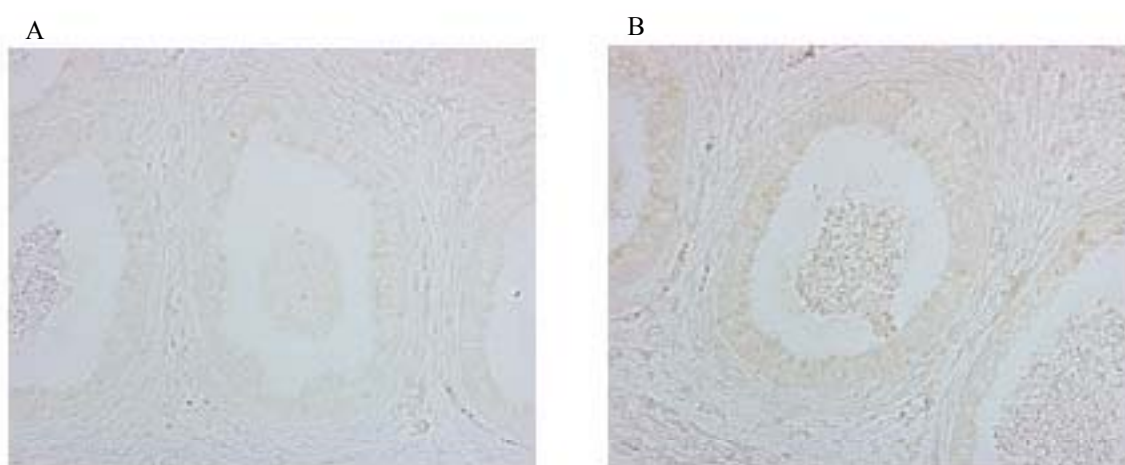


Abbildung 20: Negativkontrollen für die immunologische Detektion von hBD17 im *Caput epididymidis*. Dargestellt sind transversale Schnitte durch den humanen Nebenhodenkopf in 32-facher Vergrößerung. Zu erkennen sind von epithelialen Zellen ausgekleidete Kanäle, die von interstitiellem Gewebe umgeben sind und die im Lumen der Kanäle lokalisierten Spermatozoen. Die Visualisierung der Antikörperbindung beruht auf einer Peroxidase-Reaktion, aus der eine braune Färbung der entsprechenden Gewebeareale resultiert. A: Der MAK L11-1b-C5 wurde durch den Isotyp IgG γ -1 Maus-Antikörper ersetzt. B: Die Inkubation erfolgte mit Zellkulturmedium anstatt mit antikörperhaltigem Zellkulturüberstand. Eine spezifische Färbung trat im untersuchten Gewebe nicht auf.

3.3 Verfolgung der immunologischen Signale in den humanen Sperma-Peptidbanken

Die in der Abteilung für Präparative Peptidchemie der IPF PharmaCeuticals GmbH aus 130 ml humanem Ejakulat hergestellte Peptidbank wurde einem sogenannten "Primärscreening" unterzogen. Dazu wurden die Aliquotsätze der einzelnen pH-Pools mittels spezifischer monoklonaler Antikörper (MAK) auf Immunaktivität untersucht.

3.3.1 Primärscreening

Die Untersuchung der Aliquotsätze der Peptidbank mittels Immunoblot-Analyse führte zur Detektion von vier immunreaktiven Fraktionen im pH-Pool 4. Das entsprechende Chromatogramm ist mit den im Western Blot detektierten aktiven Fraktionen in Abbildung 21 dargestellt. Die Signalhöhen beziehen sich auf ein durch 30 ng synthetisches Zilopeptid hervorgerufenen Signal im Western Blot (entsprechend 100 %). Die quantitative Abschätzung des Peptidgehalts der Fraktionen anhand der densitometrischen Auswertung (2.6.3) ergab folgende Richtwerte:

Fraktion 22: 190 ng Peptid pro ml TEQ

Fraktion 23: 30 ng Peptid pro ml TEQ

Fraktion 24: 30 ng Peptid pro ml TEQ

Fraktion 25: 230 ng Peptid pro ml TEQ

Der Vergleich der Signalstärken von synthetischem Peptid und den einzelnen Fraktionen kann nur eine relativ ungenaue Abschätzung der Konzentration des Zilopeptids in der Stammfraktion liefern, da das natürlich gebildete Peptid in der Regel noch Vorgängen, wie posttranslationalen Prozessierungen (z.B. Abspaltung des Signalpeptids) oder posttranslationalen Modifikationen (z.B. Acetylierung, Glykosylierung), unterliegt. Der Test auf Konzentrationsabhängigkeit der Aktivitäten ergab für die Ursprungsfraktion 22 ein Detektionslimit von 0,05 ml TEQ (entsprechend ca. 6 ng Peptid). Die Ursprungsfraktion 25 wies eine wesentlich geringere immunologische Aktivität auf, als aufgrund der vorangegangenen Experimente mit dem Aliquot zu erwarten gewesen wäre (s.o.); diese lag deutlich unter der immunologischen Aktivität von Fraktion 22. Beide Fraktionen wurden auf RP-Material rechromatographiert; aufgrund des niedrigeren Detektionslimits der Ursprungsfraktion 22 erfolgten die anschließenden Isolierungsschritte mit dieser Fraktion.

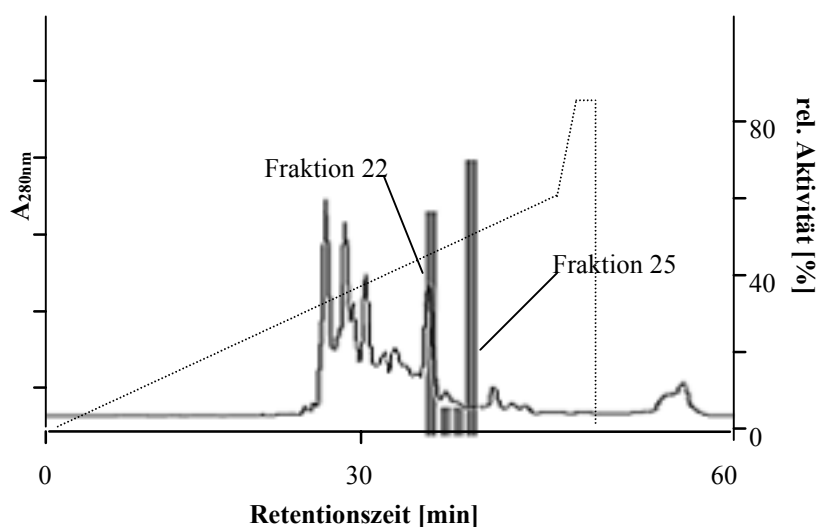


Abbildung 21: Chromatogramm des pH-Pools 4. Füllmaterial: Baker Bond C18, Säulengröße 47 x 300 mm. Gradient: 0-60 % B in 47,5 min; 60-100 % B in 2,5 min. Puffer A: 0,1 % TFA; Puffer B: 0,1 % TFA, 80 % ACN. Die Abschätzung der immunologischen Aktivität beruht auf der densitometrischen Auswertung der Blots (30 ng hBD17 entsprechen 100 %).

3.3.2 Aufreinigungsschritt 1: Reverse Phase Rechromatographie

Die Ursprungsfraction 22 wurde erneut auf C18-Material separiert. Durch die Elution mit 80 % Acetonitril/20 % H₂O und einem ansteigenden Gradienten (20-60 % in 60 min) konnte eine weitere Auftrennung des Peptidgemisches erreicht werden. Im immunologischen Test zeigten die Fraktionen 30 und 31 deutliche Signale. Die relativen Aktivitäten können dem entsprechenden Chromatogramm (Abbildung 22) entnommen werden. Das Peptidmuster der immunreaktiven Fraktionen und deren Nebenfraktionen wurde durch eine massenspektrometrische MALDI-TOF-Analyse dargestellt. Diese ergab prominente Massen von 6.181 Da und 6.635 Da in Fraktion 30. In Fraktion 31 wurden für die einzige Hauptmasse ebenfalls 6.635 Da bestimmt. Hier konnte eine Masse von 6.181 Da jedoch nicht detektiert werden.

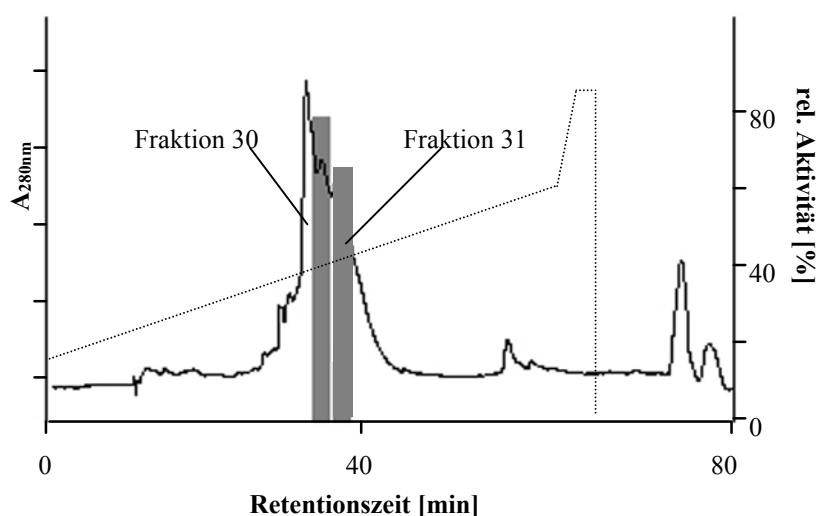


Abbildung 22: Chromatogramm des Aufreinigungsschritts 1a. Füllmaterial: Vydac C18, Säulengröße 10 x 250 mm. Gradient: 20-60 % B in 60 min; 60-100 % B in 2,5 min. Puffer A: 0,1 % TFA; Puffer B: 0,1 % TFA, 80 % ACN. Die Abschätzung der immunologischen Aktivität beruht auf der densitometrischen Auswertung der Blots (30 ng hBD17 entsprechen 100 %).

3.3.3 Aufreinigungsschritt 2a: Reverse Phase Chromatographie

Da nur eine geringe Peptidkonzentration von <100 ng/ml TEQ zu erwarten war, wurde das komplette Peptidgemisch der Fraktion 31 über eine analytische RPC18-Säule aufgearbeitet. Durch das Wechseln von Säulengröße und Gradient konnten ca. 80 % des immunologisch inaktiven Materials abgetrennt werden. Die Fraktionen 30 und 31 waren in der Immunoblot-Analyse positiv (Abbildung 23). Im MALDI-TOF-Verfahren konnte für beide Fraktionen eine Hauptmasse von 6.635 Da bestimmt werden, entsprechend der prominenten Masse der Ausgangsfraction. Fraktion 30 und 31 wurden für eine N-terminale Sequenzierung (s. 2.8.3) vereinigt. Diese ergab die folgende Hauptsequenz: S K G Q L P S G S S Q F P H G Q K G Q H Y F H Q. Nebensequenzen waren nicht auswertbar. Ein Datenbank-Abgleich (Swiss-Prot-Datenbank) zeigte, daß diese Sequenz einem Fragment des Semenogelin II-Vorläuferproteins (SGII) entspricht. Der Vergleich der Aminosäuresequenz des Fragments und von hBD17 (Abbildung 24) belegte eine Übereinstimmung von lediglich 10,3 %. Die niedrige Homologie zwischen den beiden Sequenzen deutet darauf hin, daß eine Epitoperkennung des MAK auf dem Semenogelin-Fragment nicht gegeben war. Das genannte Fragment stellte somit wohl nicht die Ursache für das detektierte immunologische Signal dar. Das eigentliche Antigen bildete vermutlich eine andere Komponente der immunologisch aktiven Fraktion.

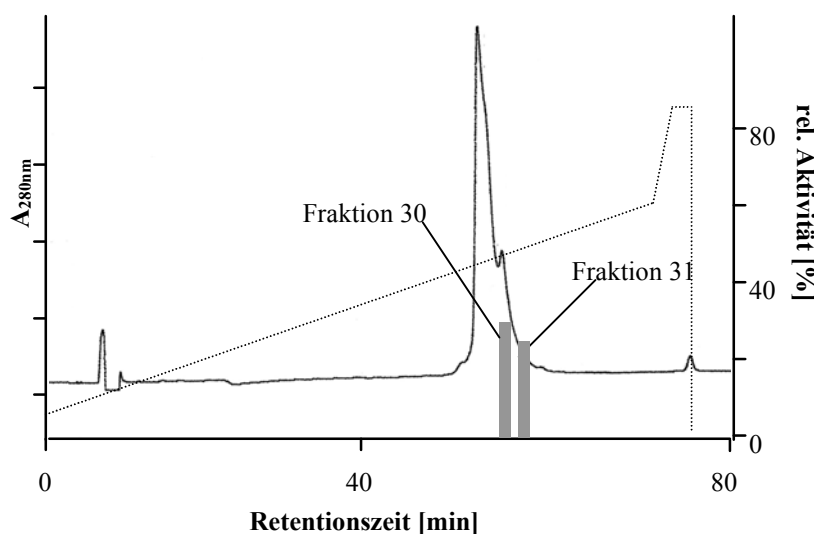


Abbildung 23: Chromatogramm des Aufreinigungsschritts 2a. Füllmaterial: Phenomenex Jupiter C18, Säulengröße 1 x 150 mm. Gradient: 10-55 % B in 70 min; 60-100 % B in 2,5 min. Puffer A: 0,1 % TFA; Puffer B: 0,1 % TFA, 80 % ACN. Die Abschätzung der immunologischen Aktivität beruht auf der densitometrischen Auswertung der Blots (30 ng synthetisches hBD17 entsprechen 100 %).

1	20	40	60	68
(1) MKLLLLTLTVLLLLSQLTPGGTORCWNLYGKCRYRCSKKERVYVYCINNKMCCVKPKYQPKERWWPF-				
(2) -----SKGQLPSGSSQ--FPHGQKGQHYFGQKDQQHTKSKGSFSIQHTYHVDINDHDWTRK				

Abbildung 24: Vergleich der Aminosäuresequenzen von hBD17 (1) und der bei der Sequenzierung gelesenen Aminosäurefolge des Fragments von Semenogelin II (2). Identische Aminosäuren in den Sequenzen sind grau unterlegt. Die Sequenz des zur Immunisierung der Mäuse verwendeten reifen Peptids ist unterstrichen.

3.3.4 Aufreinigungsschritt 2b: Kationen-Austausch-Chromatographie

Die erzielten Resultate deuteten auf eine mögliche Überlagerung des Zielpепtids durch das Semenogelin II-Fragment hin. Deshalb wurde mit der Kationen-Austausch (Kat-Ex)-Chromatographie eine andere Separationsmethode angewendet, um eine Trennung der genannten Bestandteile zu erreichen. Eingesetzt wurde eine Gewebeäquivalentmenge (TEQ) von 55,5 ml von Fraktion 30 der Aufreinigung 1a. Eine weitere Auftrennung des Materials war unter den eingesetzten Bedingungen jedoch nicht möglich (Abbildung 22). In der Western Blot-Analyse erwiesen sich die Fraktionen 27 bis 31 als immunreaktiv; die Fraktionen 28 und 29 zeigten die eindeutig höchste Aktivität (Abbildung 25). Die Masse der Hauptkomponente beider

Fraktionen lag laut MALDI-TOF-Messung bei 6.628 Da. Aufgrund der identischen Masse der Hauptbestandteile wurden die immunologisch aktivsten Fraktionen 28 und 29 vereinigt und anschließend ein weiteres Mal auf RP-Material separiert.

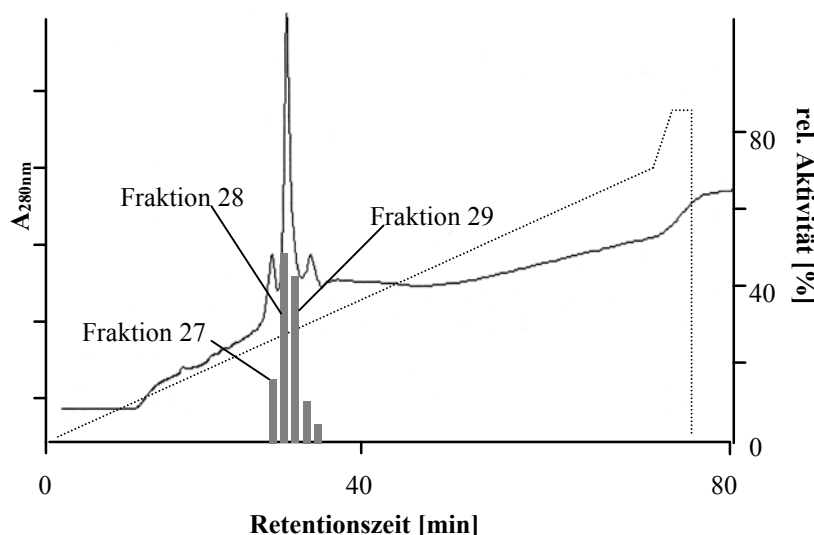


Abbildung 25: Chromatogramm des Aufreinigungsschritts 2b. Füllmaterial: Biotek Pepkat 300 A. Säulengröße 4 x 125 mm, Gradient: 0-70 % B in 70 min; 60-100 % B in 2,5 min. Puffer A: 50 mM KH_2PO_4 (pH 4,5); Puffer B: 50 mM KH_2PO_4 , 1,5 M KCl (pH 4,5). Die Abschätzung der immunologischen Aktivität beruht auf der densitometrischen Auswertung der Blots (30 ng hBD17 entsprechen 100 %).

3.3.5 Aufreinigungsschritt 3: Zweite Reverse Phase Rechromatographie

Die Trennung der Bestandteile der Fraktionen 28 und 29 der Kat-Ex-Rechromatographie aus Isolierungsschritt 2b (entspr. 110 ml Ejakulat-Äquivalent) wurde in zwei Läufen vorgenommen. Auch durch den Wechsel der Säule und die Elution mit einem langsamer ansteigenden Gradienten (10-70 % in 60 min) von Solvent B (80 % Acetonitril/20 % H_2O) konnte eine weitere Trennung der Komponenten nicht erreicht werden. Das Chromatogramm des ersten Laufes mit den entsprechenden Aktivitäten der immunreaktiven Fraktionen 30-34 ist in Abbildung 26 dargestellt. Die massenspektrometrische Analyse mittels MALDI-TOF ergab eine Hauptmasse von 6637 Da für die immunologisch aktivsten Fraktionen 32 und 33. Eine durchgeführte Kapillarzonenoelektrophorese mit einem Aliquot der Fraktion 32 belegte, daß noch mindestens drei Bestandteile mit verschiedenen molekularen Massen in der Probe vorhanden waren. Die Sequenzanalyse erfolgte mit 50 µl dieser Fraktion (s. 2.8.3) und ergab die Aminosäuresequenz GLFSKYRTPN-SQYRLPGHPRHFNPV--SDMSTYGAEENR. Diese

Sequenz konnte durch einen Datenbankabgleich einem Fragment des Acrosin-Trypsin Inhibitor II Vorläufers (HUSI-II) zugeordnet werden (Abbildung 27). Die Identität mit der hBD17-Sequenz beträgt 14,7 %. Nebensequenzen waren in der Probe nicht lesbar. Aufgrund der wenig ähnlichen Sequenzen der Moleküle erscheint eine Antikörperbindung an das HUSI-II-Fragment als nicht wahrscheinlich. Zu vermuten ist eine mengenmäßige Überlagerung der eigentlichen antigenen Komponente der immunreaktiven Fraktionen, zumal in diesem Aufreinigungsschritt keine weitere Trennung der Bestandteile der Ausgangsfraction erzielt werden konnte.

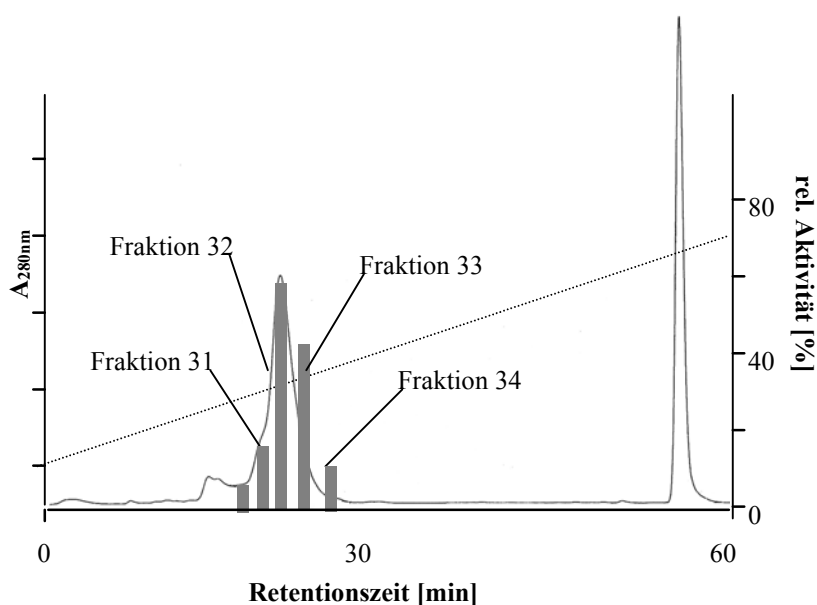


Abbildung 26: Chromatogramm des Aufreinigungsschritts 3. Füllmaterial: Phenomenex Luna C18. Säulengröße 2 x 250 mm, Fraktionen 1-65. Gradient: 10-70 % B in 60 min. Puffer A: 0,1 % TFA; Puffer B: 0,085 % TFA, 80 % ACN. Die Abschätzung der immunologischen Aktivität beruht auf der densitometrischen Auswertung der Blots (30 ng hBD17 entsprechen 100 %).

1	20	40	60	68
(1) MKLLLLTLTVLLLLSQLTPGGTQRCWNLYGKCRYRCSKKERVYVYCINNKMCCVKPKYQPKERWWPF-				
(2) -----GLFSKYRTPNSQ-YRLPGHPRHFNPVSDMSTYGAENR-----				

Abbildung 27: Vergleich der Aminosäuresequenzen von hBD17 (1) und der bei der Sequenzierung gelesenen Aminosäurefolge des Fragments von Acrosin-Trypsin Inhibitor II (HUSI-II) (2). Identische Aminosäuren in den Sequenzen sind grau unterlegt. Die Sequenz des zur Immunisierung der Mäuse verwendeten reifen Peptids ist unterstrichen.

3.4 Herstellung von Peptidbanken aus humanem Ejakulat

Die unter Punkt 2.5.3 beschriebene saure Extraktion der Proteine aus humanem Ejakulat und die anschließende Diafiltration führten zu Permeaten eines Volumens von 6,9 l in der Spermatozoen-Fraktion bzw. 9,5 l aus dem Seminalplasma (molekularer Größenausschluß jeweils 50 kDa). Diese Permeate bildeten den Grundstock für die Herstellung der Peptidbanken und wurden jeweils einer pH-Stufenelution unterzogen (2.5.4.1).

Durch die Verwendung eines starken Kationentauschers und die stufenweise Elution der gebundenen Peptide mittels verschiedener Lösungen mit ansteigendem pH-Wert (2,5-13) erfolgte in der ersten Dimension eine Trennung der Peptide nach ihrem isoelektrischen Punkt (pI). Die chromatographischen Trennungen sind in Abbildung 28 und Abbildung 29 dargestellt.

Anionische Peptide und andere Zellbestandteile, wie z.B. Kohlenhydrate, die nicht auf dem Ionentauscher binden (KOOK *et al.*, 1975), wurden ebenfalls abgetrennt und bildeten den jeweiligen pH-Pool 0. Nach Absinken der Absorption bei 280 nm unter einen Minimalwert von 0,3 wurde jeweils das Elutionsmittel gewechselt. Die resultierenden Eluate wurden separiert und ihr Proteingehalt nach der Bradford-Methode (BRADFORD, 1976) bestimmt (Tabelle 4).

Defensine sind, wie die Mehrzahl der antimikrobiellen Peptide (HANCOCK und LEHRER, 1998), kationisch. Durch die Abtrennung von nicht-ionischen und anionischen Peptiden und anderen Zellbestandteilen, wie Oligosacchariden und Phospholipiden, wurden somit im Ejakulat vorkommende Defensine aufkonzentriert. Von allen getesteten Geweben konnte in *Taqman*-Analysen die höchste Expression von hBD17 im humanen Nebenhoden nachgewiesen werden (RODRIGUEZ-JIMENEZ, 2003). Humanes Ejakulat sollte somit eine geeignete Quelle zur Isolation des Zielseptids darstellen. Im Vergleich zum Gesamtproteingehalt des Ejakulats war ein Vorkommen von hBD17 nur in geringen Konzentrationen zu erwarten. Um dieses dennoch im immunologischen Test detektieren zu können, mußten eine Abtrennung von inaktivem Material und eine Anreicherung aktiver Bestandteile erreicht werden. Deshalb wurden die pH-Pools in einem zweiten Schritt unter Anwendung der RP-Chromatographie erneut separiert (Abbildung 30 und Abbildung 31). Damit wurden zunächst die Peptide und Proteine von Salzen und anderen, an RP-Material nicht bindenden Bestandteilen des Ejakulats getrennt. Eine Auftrennung des Protein/Peptidgemisches konnte durch die Elution mit 80 % Acetonitril/20 % H₂O und einem ansteigenden Gradienten (0-60 % in 60 min) erreicht werden.

Während jeder Chromatographie eines pH-Pools wurden 42 Fraktionen gesammelt, denen Aliquots von je 1,4 ml Gewebeäquivalent entnommen wurden. Diese Aliquots wurden im immunologischen Test untersucht, es konnten jedoch keine spezifischen reproduzierbaren Banden detektiert werden.

Tabelle 4: Peptidgehalt der pH-Pools (ermittelt durch Bradford-Bestimmung).

Spermatozoen-Peptidbank			
Peak	pH-Pool	Protein/Peptidgehalt [mg]	Anteil [%]
Durchlauf	0	283	21
1	1	19	1
2	2	111	8
3	3	203	15
4	4	110	8
5	5	135	10
6	5	263	20
7	5	138	10
8	5	32	2
9	5	43	3
Seminalplasma-Peptidbank			
Peak	pH-Pool	Protein/Peptidgehalt [mg]	Anteil [%]
Durchlauf	0	551	10
1	1	396	7
2	2	645	11
3	3	759	13
4	4	510	9
5	5	696	12
6	6	810	14
7	7	738	13
8	7	283	5
9	7	283	5

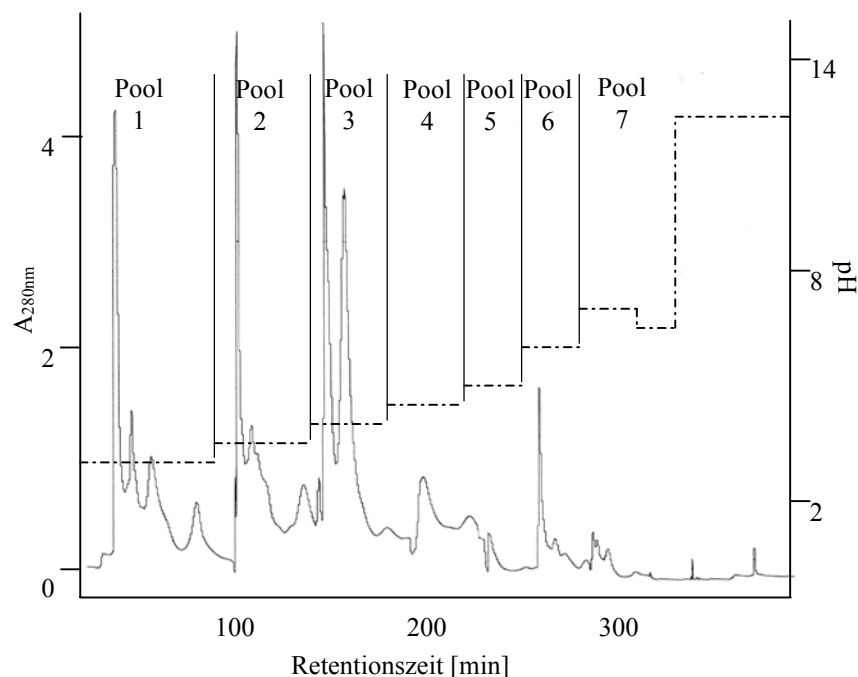


Abbildung 28: Kationen-Austausch-Chromatographie des aus dem Seminalplasma gewonnenen Extrakts. Die einzelnen pH-Pools repräsentieren die extrahierten Peptide aus dem in 280 ml Ejakulat enthaltenen Seminalplasma nach Elution von einem starken Kationentauscher mit verschiedenen Lösungen mit ansteigendem pH-Wert (s. 2.5.4.1). Auf der linken Ordinatennachse ist die Extinktion bei 280 nm aufgetragen. Die rechte Ordinate gibt den pH-Wert an. Der Gradient der eingesetzten Elutionsmittel ist durch die gestrichelte Linie dargestellt.

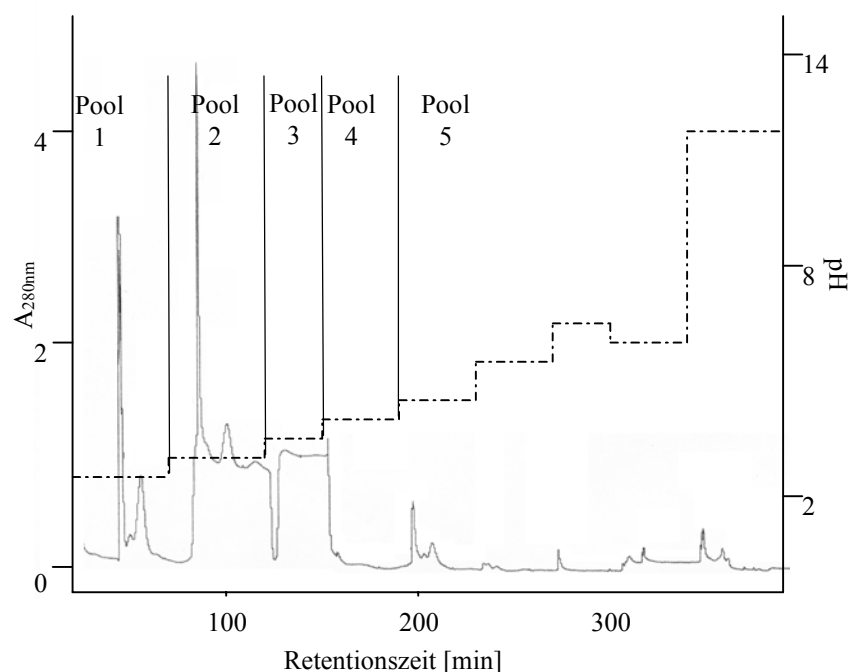


Abbildung 29: Kationen-Austausch-Chromatographie des Spermatozoen-Extrakts. Die einzelnen pH-Pools repräsentieren die extrahierten Peptide aus den in 280 ml Ejakulat enthaltenen Spermatozoen nach Elution von einem starken Kationentauscher mit verschiedenen Lösungen mit ansteigendem pH-Wert (s. 2.5.4.1). Auf der linken Ordinatennachse ist die Extinktion bei 280 nm aufgetragen. Die rechte Ordinate gibt den pH-Wert an. Der Gradient der eingesetzten Elutionsmittel ist durch die gestrichelte Linie dargestellt.

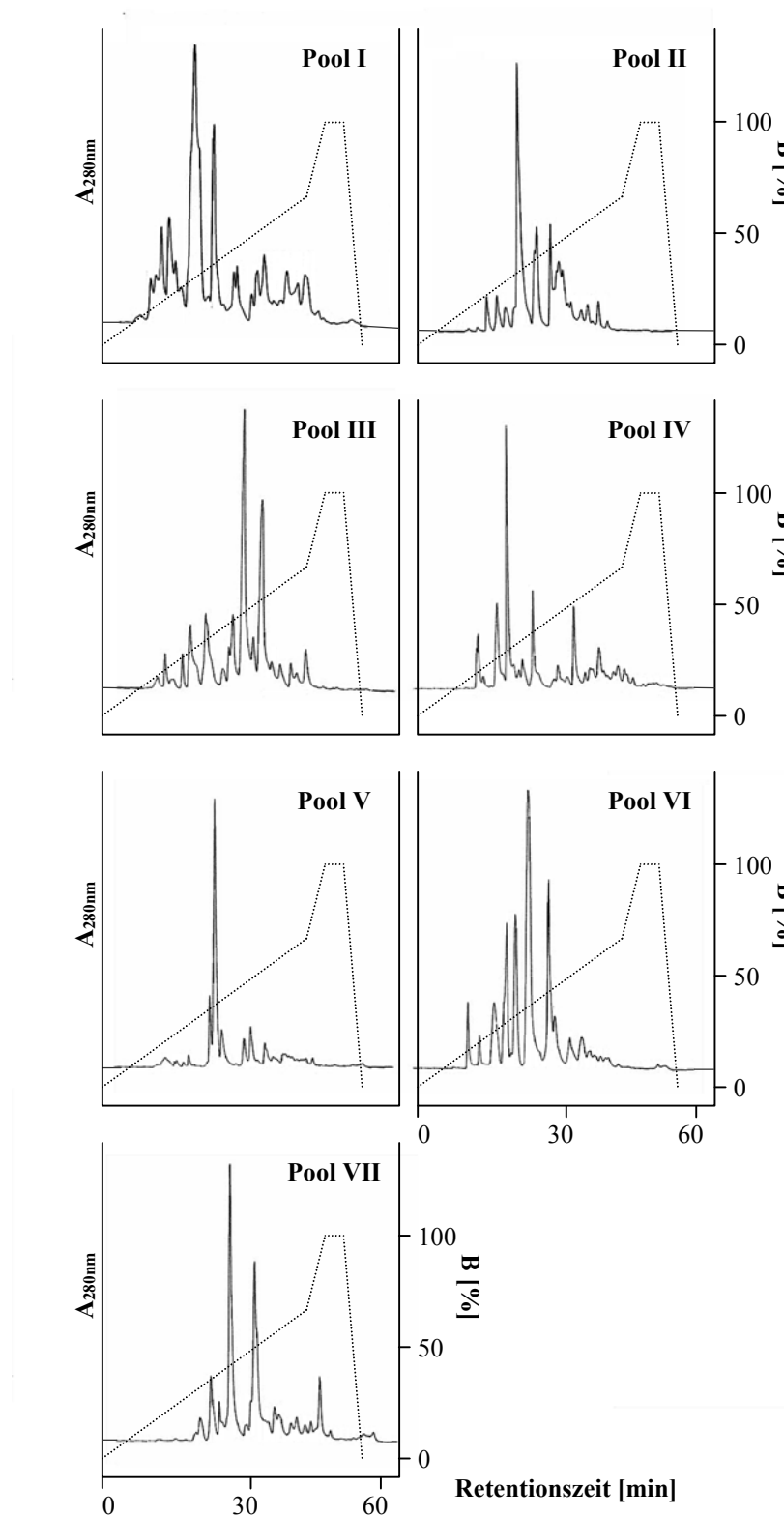


Abbildung 30: Reverse Phase Chromatographie der pH-Pools der aus Seminalplasma hergestellten Peptidbank. In den Chromatogrammen 1-7 sind die Elutionsprofile der einzelnen pH-Pools bei einer Absorptionswellenlänge von 280 nm und die zur Elution verwendeten Gradienten dargestellt.

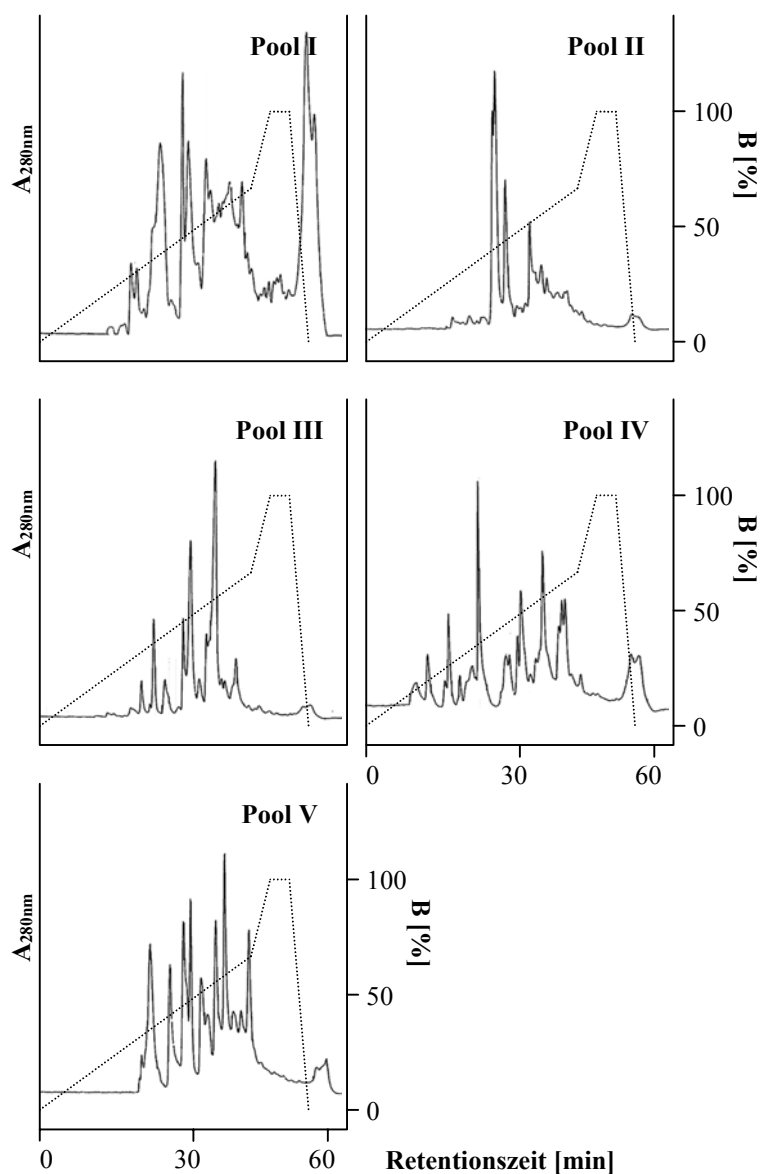


Abbildung 31: Reverse Phase Chromatographie der pH-Pools der aus den Spermatozoen hergestellten Peptidbank. In den Chromatogrammen 1-5 sind die Elutionsprofile der einzelnen pH-Pools bei einer Absorptionswellenlänge von 280 nm und die zur Elution verwendeten Gradienten dargestellt.

3.5 Alternative Aufreinigungsstrategien

Da keine weiteren immunologischen Aktivitäten in den Aliquotsätzen der humanen Sperma-Peptidbanken detektiert werden konnten, wurde unbehandeltes humanes Ejakulat in verschiedenen Verdünnungen elektrophoretisch aufgetrennt und in der Western Blot-Analyse mit dem MAK L11-1b-C5 getestet. Um Artefakte auszuschließen, die aus einer unspezifischen Zweitantikörperbindung resultieren können, wurden die Membranen geteilt. Ein Teil der proteinbeladenen Membranen wurde in Blockierungsreagenz ohne primären Antikörper

inkubiert. Diese Negativkontrollen verursachten keinerlei immunreaktive Signale. Die Sichtbarmachung der Antikörperbindung auf den mit dem spezifischen MAK inkubierten Membranteilen führte zu einem konzentrationsabhängigen Bandenmuster einer Größe von etwa 30 kDa (Abbildung 32, n=3). Zur Verfolgung dieser Immunaktivität wurde der aufgereinigte MAK L11-1b-C5 (s. 2.3) an das Bettmaterial einer Protein A-Säule gekoppelt. Diese Säule wurde für die Immunaффinitätschromatographie von bis zu 10 ml Ejakulat genutzt. In den entsprechenden Eluaten konnten jedoch keine immunologischen Aktivitäten detektiert werden; es traten weder Banden einer Größenordnung von 4 kDa noch von 30 kDa auf (nicht gezeigt).

Eine weitere Verfolgung der bisher geschilderten Strategien zur Isolation von hBD17 erschien aus mehreren Gründen nicht sinnvoll: A) Von den detektierten immunreaktiven Fraktionen aus den verschiedenen Aufreinigungen war nicht mehr genügend Material für erfolgversprechende, weitere Isolierungsschritte vorhanden. Auch die immunologisch aktiven Stammfraktionen der Peptidbank aus 130 ml Gesamtejakulat waren komplett aufgearbeitet. B) In den aus 280 ml Ejakulat hergestellten Spermatozoen- und Seminalplasma-Peptidbanken traten keine reproduzierbaren Signale im immunologischen Test auf. Dieser Sachverhalt spricht für eine Beteiligung weiterer Faktoren bei der Regulation der Expression bzw. Sekretion von hBD17 im humanen Nebenhoden. C) Die Immunaффinitätschromatographie von Ejakulatmengen, die unter Zugrundelegung der gefundenen immunologischen Signale in den Stammfraktionen der Ejakulat-Peptidbank sicher detektierbare Mengen an hBD17 enthalten mußten, führte zu keiner Aufreinigung des Zielpeptids.

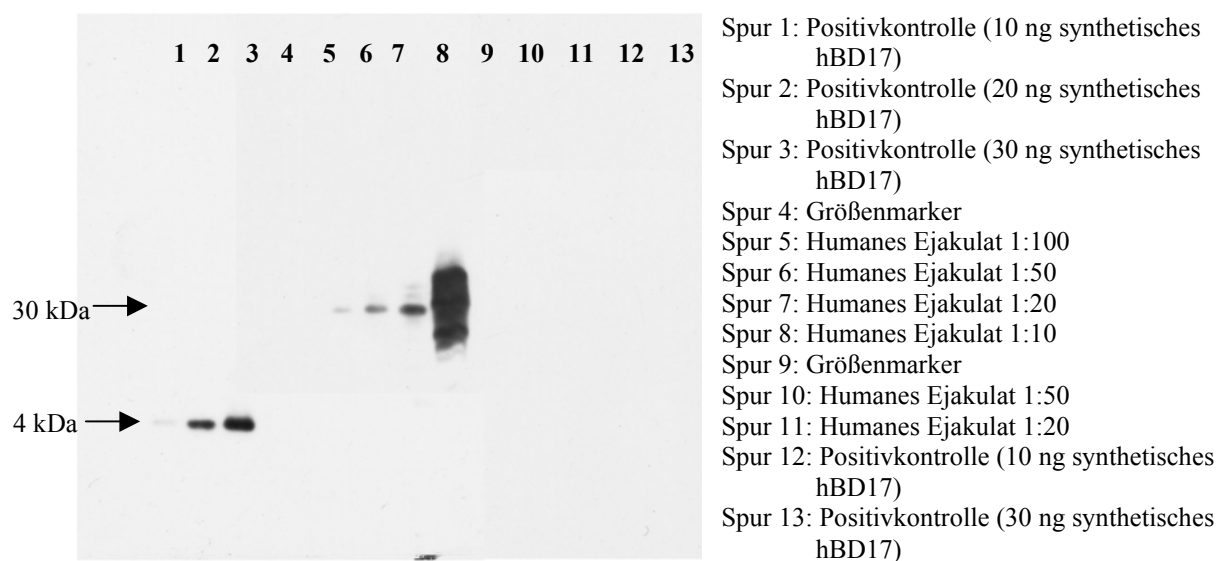


Abbildung 32: Immunoblot mit humanem Ejakulat in verschiedenen Verdünnungen. Der Membranteil mit den Spuren 1-9 wurde mit dem MAK L11-1b-C5 inkubiert, der andere Teil der Membran (Spuren 10-13) diente nach einer Inkubation ohne primären Antikörper als Negativkontrolle. Die Größen der immunreaktiven Banden sind durch Pfeile verdeutlicht.

4 Diskussion

Vor dem Hintergrund zunehmender Resistenzentwicklung pathogener Bakterien gegenüber klinisch eingesetzten Antibiotika gewinnt die Erforschung antimikrobiotischer Peptide immer mehr an Bedeutung (GIGLIONE und MEINNEL, 2002). Defensine nehmen wegen ihrer Fähigkeit, Poren in bakteriellen Membranen zu bilden, eine Schlüsselstellung in der körpereigenen Abwehr von Mikroorganismen ein (BAUER *et al.*, 2001). Einige β -Defensine entwickeln ihre vollständige antimikrobielle Aktivität bei physiologischen Salzkonzentrationen und sind somit als potentielle Antibiotika besonders interessant (GANZ, 1999). Weiterhin interagieren viele sekretorische, im Nebenhoden exprimierte Proteine mit den Spermatozoen und nehmen so Einfluß auf Reifung, Motilität und Fertilisationsfähigkeit der Spermien (YENUGU *et al.*, 2003). Expressionsanalysen für eine Anzahl von β -Defensinen zeigten, daß hBD17 vergleichsweise stark im humanen Nebenhoden exprimiert wird (RODRIGUEZ-JIMENEZ, 2003). Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, das neue humane β -Defensin hBD17 als potentiellen antimikrobiotischen und fertilitätsbeeinflussenden Wirkstoff im männlichen Reproduktionstrakt zu lokalisieren und es aus humanen Gewebe-Peptidbanken zu isolieren bzw. im zellfreien System zu translatieren. Dazu wurden spezifische, monoklonale Antikörper gegen das Zielpeptid hergestellt und charakterisiert.

4.1 hBD17 wird in Epithelzellen des *Caput epididymidis* exprimiert

In den durchgeführten immunhistologischen Experimenten zum Nachweis von hBD17 konnte eine spezifische Färbung in zwei Bereichen der transversalen Schnitte durch den *Caput epididymidis* des Menschen detektiert werden. Dies waren A) die apikalen Regionen der das Lumen der ausführenden Gänge auskleidenden Epithelzellen und B) Vesikel, die sich im Seminalplasma in unmittelbarer Nähe zu den Spermatozoen befanden (3.2.2).

Epithelien bilden die Grenze zwischen Organismus und der oft lebensfeindlichen Umgebung und sind ständig einer großen Vielfalt von potentiellen Eindringlingen ausgesetzt (FROHM NILSSON *et al.*, 1999). Die Synthese von antimikrobiellen Wirkstoffen in epithelialen Zellen stellt sehr wahrscheinlich einen Schutz gegen mikrobielle Angriffe als Element der angeborenen Immunabwehr dar. Zahlreiche Beispiele belegen diese Annahme: So wurde das humane β -Defensin 3, das eine starke antimikrobiotische Wirkung gegenüber gram-negativen und gram-positiven Bakterien und auch gegenüber Pilzen aufweist, in den Epithelien vieler Organe

gefunden, z.B. in *Placenta*, *Testis*, *Oesophagus* und *Trachea* (GARCIA *et al.*, 2001a). Zudem werden Defensine auch in epithelialen Zellen des humanen weiblichen Reproduktionstrakts exprimiert (VALORE *et al.*, 1998). QUAYLE *et al.* (1998) beschreiben eine Expression von HD-5 in apikalen Teilen von Epithelzellen, die dem Endometrium und der Endocervix entnommen wurden. Für eine Expression von hBD17 im epididymalen Epithelium in seiner Eigenschaft als antimikrobielles Peptid spricht auch der Nachweis von anderen antimikrobiotischen Peptiden (diverse Defensine, HE2, hCAP18, β -Defensin-ähnliche EP2-Varianten) im gleichen Gewebe verschiedener Spezies (COM *et al.*, 2003). Auch für Bin1b, ein im Fortpflanzungsapparat von männlichen Ratten exprimiertes, β -Defensin-ähnliches Protein, konnte eine spezifische Immunfärbung in Epithelzellen gezeigt werden, welche die ausführenden Kanäle des *Caput epididymidis* auskleiden. In Übereinstimmung mit den für hBD17 gefundenen Resultaten der durchgeführten immunhistochemischen Versuche trat in anderen Teilen des Nebenhodens (*Corpus*, *Cauda*) keine spezifische Färbung auf (LI *et al.*, 2001). Die Spermatozoen sind auf ihrem Weg durch den *Ductus epididymidis* prinzipiell durch den Angriff von sexuell übertragbaren Bakterien und Viren gefährdet. Verschiedene Proteine, wie die kationischen Peptide hBD1, Bin1b und das Cathelizidin hCAP18, verteidigen daher den männlichen reproduktiven Trakt gegen eindringende Pathogene (HAMIL *et al.*, 2002). Eine Sekretion von antimikrobiotisch wirksamen Molekülen in die Seminalflüssigkeit scheint somit auch für den Schutz der Spermatozoen notwendig zu sein.

Einen anderen Ansatz vertreten COM *et al.* (2003), die hBD1 immunhistochemisch auf humanen Spermatozoen und in der Seminalflüssigkeit nachweisen konnten. Die Autoren vermuten deshalb, daß die Spermatozoen für ihre Wanderung durch den männlichen und weiblichen Reproduktionstrakt mit der Expression von hBD1 eine eigene Verteidigung ausgebildet haben, da sie nicht mehr von testikulären somatischen Zellen gegen mikrobielle Angriffe geschützt werden. Die im Rahmen der durchgeführten immunhistochemischen Versuche erhobenen Daten sprechen jedoch nicht für eine Synthese von hBD17 in oder auf den Spermatozoen, zumal keine Immunfärbung von Teilen der Spermatozoen beobachtet werden konnte. Diese Daten werden auch durch den Umstand gestützt, daß in den im Nebenhoden gespeicherten Spermatozoen nur eine äußerst geringe Transkription und Translation von Genen abläuft und die meisten für die Reifung der Spermatozoen wichtigen Proteine infolgedessen vom Epithel der Epididymis sekretiert werden (PERRY *et al.*, 1999). Vor diesem Hintergrund legt die intrazelluläre Lokalisation der spezifischen Färbung im apikalen Bereich der Epithelzellen in Verbindung mit der Immunfärbung der Vesikel in der Seminalflüssigkeit die Vermutung nahe, daß hBD17 von den epithelialen Zellen in das Lumen der ausführenden Kanäle sekretiert wird. RODRIGUEZ-

JIMENEZ (2003) fand im gleichen Gewebe für hBD4 eine spezifische Immunfärbung in basalen und apikalen Arealen der Epithelzellen und ebenfalls in Vesikeln, die sich im Seminalplasma in unmittelbarer Nähe zu den Spermatozoen befanden. Der Autor spekulierte, daß das Peptid im basalen Teil der Zelle gebildet und in Vesikeln zur apikalen Membran transportiert wird, wo die Sekretion in das epididymale Lumen erfolgt. Im Gegensatz dazu vermuten VALORE *et al.* (1998) aufgrund der Resultate ihrer immunhistochemischen Experimente, daß hBD1 im Urogenitaltrakt ohne vorherige intrazelluläre Speicherung sekretiert wird. Denkbar ist, daß hBD17 während der Synthese am rauen Endoplasmatischen Reticulum und während des Transports im Golgi-Apparat, der in anterograden Vesikeln erfolgt (GLICK und MALHOTRA, 1998), in Konzentrationen vorliegt, die keine Immunfärbung hervorrufen. An der negativ geladenen Epitheloberfläche kommt es dann möglicherweise zu einer Aufkonzentration des Peptids, was das Auftreten der spezifischen Färbung ausschließlich im apikalen Teil der Epithelzellen erklären würde. Diese Konzentration an den Oberflächen der epithelialen Zellen des Urogenitaltrakts wurde von VALORE *et al.* (1998) auch für hBD1 beschrieben.

Der Nebenhoden ist ein röhrenförmiges Organ, welches der Speicherung, der Reifung und dem Transport von Spermatozoen dient (KIRCHHOFF, 1999). Epididymale Spermatozoen weisen keine Vorwärtsbewegungen auf und können nicht aus eigener Kraft mit Eizellen interagieren. Auf ihrer Wanderung durch die ausführenden Gänge und durch die verschiedenen Segmente des Nebenhodens unterliegen die Spermatozoen einer weiteren Reifung (Maturation), die sie erst zur Befruchtung befähigt (LEGARE *et al.*, 1999). Der Mechanismus dieser Reifung und der Beteiligung epididymaler Proteine ist noch nicht vollständig verstanden (HAMIL *et al.*, 2003). Die Maturation umfaßt komplexe Modifikationen der Oberfläche der Spermatozoen, der intrazellulären Membranen und der Organellen. Damit gehen Änderungen in der Zusammensetzung der Plasmamembranen und eine ausgeprägte Umbildung von Oberflächen- und intrazellulären Proteinen einher (PERRY *et al.*, 1999). Die sekretierten epididymalen Proteine nehmen Einfluß auf die Motilität und andere Funktionen der Spermatozoen, indem sie an die Plasmamembran adsorbieren oder in diese integriert werden (HAMIL *et al.*, 2000). MALM *et al.* (2000) beschreiben eine starke Verbindung des humanen kationischen antimikrobiellen Proteins hCAP18 mit der Oberfläche der Spermatozoen. Die Autoren vermuten, daß dadurch hCAP18 von den Spermatozoen zur Eizelle mitgeführt wird, um während der Fertilisation einen Schutz gegen Mikroorganismen zu bieten. Eine starke Expression von hCAP18 wurde auch in den Epithelzellen von *Corpus epididymidis* und *Cauda epididymidis* und in der Seminalflüssigkeit nachgewiesen, was auf eine Schlüsselstellung des Proteins im Reproduktionsprozeß hindeutet (MALM *et al.* 2000). RAO *et al.* (2003) konnten im Rattennebenhoden ein sekretorisches

Glykoprotein (E-3) identifizieren, welches das für β -Defensine typische Verbrückungsmuster über sechs Cysteine aufweist und ebenfalls mit den Spermatozoen assoziiert ist. Diese Gemeinsamkeiten deuten auf eine Funktion der β -Defensine im Mechanismus von Maturation und/oder Fertilisation hin. hBD17 konnte in der vorliegenden Arbeit im Lumen der epididymalen Kanäle immunhistochemisch nachgewiesen werden. Die resultierende spezifische Färbung trat in Vesikeln auf, die sich in unmittelbarer räumlicher Nähe zu den Spermatozoen befanden. Eine Assoziation der Vesikel mit den Spermatozoen war jedoch nicht zu erkennen; die Spermatozoen selbst zeigten keine spezifische Färbung. Dieser Sachverhalt läßt darauf schließen, daß hBD17 keinen Einfluß auf direkte Interaktionen von Spermatozoen und Eizelle hat. Eine Beteiligung des Zielpeptids am Maturationsprozeß erscheint als nicht sehr wahrscheinlich, da das hBD17-Peptid mit der Membran der Spermatozoen offenbar nicht in direkten Kontakt tritt. Die Existenz von proteinhaltigen Vesikeln in Seminalflüssigkeit aus dem Nebenhoden, die von Spermatozoen getrennt worden war, ist im Rattenmodell nachgewiesen (FORNES *et al.*, 1991). Zu berücksichtigen ist jedoch, daß hBD17 in den epididymalen Epithelzellen möglicherweise nur aufgrund der intrazellulären Aufkonzentration an der apikalen Membran anfärbbar war. Somit wäre auch eine Verteilung von hBD17 in einer nicht immunhistochemisch nachweisbaren Konzentration auf der Spermatozoenoberfläche denkbar. KIRCHHOFF und Mitarbeiter identifizierten 1998 sechs Epididymis-spezifische Proteine (HE1-HE6), die alle in den Epithelzellen des Nebenhodenganges exprimiert werden. Fünf dieser Proteine werden in das Lumen des Ganges sekretiert und treten mit den Spermatozoen in Kontakt (KIRCHHOFF *et al.* 1998). Die Autoren postulieren eine lokale Spezialisierung und Regulierung der Genexpression in der humanen Epididymis aufgrund des vorwiegenden Auftretens des jeweiligen Proteins in den einzelnen Segmenten des Nebenhodens. Da hBD17 ebenfalls nur im Epithel des *Caput epididymidis* immunhistologisch nachgewiesen werden konnte, ist eine Beteiligung am Reifungsprozeß der Spermatozoen nicht auszuschließen. Die Fragen, ob das Zielpeptid mit der Membran der Spermatozoen interagiert, einen Einfluß auf die Motilität der Keimzellen hat oder ausschließlich der Bereitstellung optimaler Bedingungen zur Speicherung der Spermatozoen dient, können anhand der erzielten Resultate nicht mit Sicherheit beantwortet werden. Diese Fragestellungen sollten Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

4.2 Die *in vitro* Translation von hBD17 ist von mehreren Faktoren abhängig

Das hBD17-Peptid konnte in den Reaktionsprodukten der *in vitro* Translation mit dem aus dem Klon K1 isolierten Vektor nicht nachgewiesen werden. Das Kontrollpeptid NSP 5 konnte

hingegen im angewendeten gekoppelten *in vitro* Transkriptions/Translations-System synthetisiert werden (s. 3.1.2). Daher schien es wahrscheinlich, daß die nicht erfolgte Translation von hBD17 in einem Merkmal in der Nukleotidsequenz des genannten Vektors begründet war. In der Sequenzanalyse zeigte sich, daß dem Offenen Leserahmen ein zusätzliches, nicht im Leserahmen gelegenes Startcodon vorgelagert war. Nach einem kurzen Sequenzabschnitt (21 Bp) folgt ein Stopcodon (s. Abbildung 6). Eine Translation dieser Sequenz würde die Synthese eines Moleküls mit der Aminosäurenfolge M L E R P P V zur Folge haben. In den durchgeführten Experimenten wurden die Translationsprodukte durch ³⁵S-Cystein radioaktiv markiert. Dieses Molekül könnte also in der Autoradiographie nicht detektiert werden, da seine Aminosäurenfolge keine Cysteine beinhaltet. Eine ab dem genannten Startcodon erfolgte Translation könnte somit die Ursache dafür sein, daß auf den Autoradiographien keine durch ein Reaktionsprodukt hervorgerufene Bande auftrat. Denkbar ist auch eine Translation der entsprechenden Sequenzen sowohl ab dem nicht im Leserahmen gelegenen Startcodon, als auch ab den im Leseraster befindlichen Startcodons. In dieser Synthese von mehreren Produkten könnte das hBD17 mengenmäßig so unterrepräsentiert gewesen sein, daß das Peptid kein vom Hintergrund unterscheidbares Signal hervorrief.

Um diese möglichen Ursachen für eine Hemmung der Expression von hBD17 zu beseitigen, wurden das nicht im Leserahmen befindliche und das erste im Leseraster gelegene Startcodon gentechnisch entfernt (Abbildung 10). Nach der erfolgreichen Deletion der vorgelagerten Startcodons konnte jedoch auch mit dem entsprechenden Vektor B1 keine Synthese von hBD17 in dem System erzielt werden. Eine Überlagerung einer Bande durch den ausgeprägten Hintergrund ist unwahrscheinlich, da auch in der Immunoblot-Analyse mit dem spezifischen MAK kein Unterschied im Bandenmuster im Vergleich zur Negativkontrolle zu detektieren war (Abbildung 12). Eine mögliche Erklärung wäre, daß im durchgeführten Experiment die Transkription zu einer mRNA führte, die im Bereich ihrer 5'-untranslatierten Region (5'UTR) mit der Vektor-DNA hybridisierte und deshalb eine Translation blockierte. Eine solche Blockade der Translation beobachteten auch LIEBHABER *et al.* (1984) im Kaninchen-Retikulozyten-System für α - und β -Globin mRNAs und deren korrespondierende cDNA-Fragmente, die sich auf die 5'-UTR der RNA erstrecken. In der Literatur ist auch eine Inhibition der *in vitro* Translation im genannten System aufgrund der Ausbildung stabiler Sekundärstrukturen in der 5'-UTR, die vermutlich das Erreichen des Startcodons durch die 40 S-Untereinheit des Ribosoms verhindern, mehrfach beschrieben worden (GRENS und SCHEFFLER, 1990; RAO *et al.*, 1988; GUAN und WEINER, 1989). Die Bildung einer solchen stabilen Sekundärstruktur in Bereichen der mRNA, die aus der Transkription des für hBD17 kodierenden Vektor-Fragments resultierte, könnte

ebenfalls ein möglicher Grund für die nicht erfolgte Translation sein.

Ebenfalls möglich wäre ein Einfluß auf die Translation durch die dem 5'-Ende der mRNA aufsitzenden Kappe. Diese Kappe aus methyliertem Guanosin erleichtert die Interaktion mit den '*Cap-binding proteins*' durch die Denaturierung von Teilen der Sekundärstruktur am 5' Terminus der mRNA während der Bildung eines "Initiationskomplexes" mit der 40 S Untereinheit der Ribosomen und somit die Translation (LIEBHABER *et al.*, 1984). Ein mögliches Nichtausbilden dieser Kappe könnte in den vorliegenden Versuchen die Translationseffizienz soweit vermindert haben, daß ein Nachweis des gewünschten Translationsprodukts nicht realisierbar war. KOZAK (1998) stellte in Experimenten unter Verwendung des Retikulozytenlysats-Systems der Firma Promega jedoch fest, daß eine Translation von mRNA mit oder ohne Kappe mit nahezu gleicher Effizienz verlief. Da in der vorliegenden Arbeit das gleiche System zur Anwendung kam, erscheint die Inhibierung der hBD17-Synthese aufgrund einer fehlenden Kappe der mRNA als wenig wahrscheinlich.

KOZAK (1998) beschreibt in derselben Veröffentlichung eine schnelle Degradation der gebildeten mRNA, auf die auch ein Zusatz von RNase-Inhibitor keinen Einfluß hatte. Der Autor vergleicht die Retikulozytenlysats-Systeme der Firmen Promega und Böhrringer Mannheim und konnte nach 9 min Inkubation bei 30 °C im Translationssystem von Promega nur einen Anteil von 14 % der gebildeten mRNA detektieren, im Gegensatz zu 50 % im System der Firma Böhrringer Mannheim. Der Autor diskutiert die negativen Auswirkungen dieser schnellen Degradation vor allem auf Experimente, die vom Vorhandensein einer intakten mRNA abhängen. Die im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten Versuche zur *in vitro* Translation beinhalteten Inkubationszeiten von 90 min. Eine Translation eines Produkts in einer geringen, unter der Nachweisgrenze liegenden Menge aufgrund der Degradation eines erheblichen Anteils der mRNA scheint demnach auch möglich.

Ob einer der genannten Faktoren ausschlaggebend für die Inhibierung der *in vitro* Translation oder ob ein Zusammenspiel mehrerer Umstände maßgeblich war, kann anhand der vorhandenen Daten nicht entschieden werden. Für die Weiterverfolgung einer *in vitro* Transkription/Translation von hBD17 wäre es somit sinnvoll, die Degradationsrate der mRNA zu bestimmen. Dieses könnte mit einer von KOZAK (1998) beschriebenen, sogenannten '*toeprint*'-Analyse geschehen.

4.3 Eine Denaturierung des Antigens beeinflusste die Nachweisgrenze der einzelnen immunologischen Analysemethoden

Zur Auswahl der geeigneten Methoden zur Detektion von hBD17 wurden zunächst 20 der generierten, gegen hBD17 gerichteten MAK in verschiedenen Testsystemen (ELISA, Dot Blot, Western Blot) auf ihre Sensitivität und Spezifität gegenüber dem synthetischen Antigen charakterisiert. Von diesen MAK verursachten 15 starke, 3 mittlere und 2 schwache Signale in der ELISA-Analyse. Um die Kompatibilität der Untersuchungsmethoden zu überprüfen, wurden die entsprechenden antikörperhaltigen Zellkulturüberstände zum Nachweis von verschiedenen Mengen an synthetischem hBD17 in Western Blot und Dot Blot eingesetzt. In der Literatur finden sich widersprüchliche Angaben bezüglich der Vergleichbarkeit der genannten Analysen. Die Resultate der durchgeführten Experimente zeigten starke Abweichungen zwischen den einzelnen Methoden (3.2.1).

Die Auswahl von antikörperhaltigen Zellkulturüberständen wurde im Immunoblot mit einer Verdünnungsreihe des synthetischen Zilopeptids auf Sensitivität getestet. Die Ergebnisse von ELISA- und Western Blot-Analyse wichen bei der Charakterisierung einiger MAK erheblich voneinander ab. Obwohl in der Literatur vornehmlich gute Korrelationen der Signalstärken in Western Blot, Dot Blot und ELISA beschrieben werden (BAXTER *et al.*, 2002; NAGY *et al.*, 2002; GUZMAN-VERRI *et al.*, 2002; SUCHANOVA *et al.*, 1991; HECKERT *et al.*, 1992), sind auch Studien dokumentiert, in denen mit demselben MAK ein Nachweis des entsprechenden Antigens mit der einen Methode gelang, mit der anderen jedoch nicht. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus der Charakterisierung der MAK L9-11b-A5 und L9-11b-E1, die in der ELISA-Analyse die stärksten Signale aufwiesen, mit denen die eingesetzten Mengen an synthetischem hBD17 im Western Blot aber nicht nachweisbar waren, konnten OZYORUK *et al.* (2001) mit drei murinen, gegen ein Oberflächen-Glykoprotein des Ziegen Arthritis-Enzephalitis-Virus gerichteten MAK das Antigen im ELISA, nicht aber im Western Blot detektieren. Dieses war auch der Fall bei monoklonalen Antikörpern gegen ein Protein, das aus einem Extrakt aus der Larvenform des humanen Endoparasiten *Strongyloides stercoralis* gewonnen wurde (TAWEETHAVONSAWAT *et al.*, 2002). Beide Autorengruppen führen diese Diskrepanz der Nachweismöglichkeiten in den beiden Systemen auf eine unterschiedliche Epitopzugänglichkeit durch die MAK zurück, die abhängig ist von der erfolgten Denaturierung bzw. Reduzierung des Antigens und damit vom konformativen Zustand der Bindungsstelle auf dem Antigen. Ein weiteres Indiz für die Abhängigkeit der Epitoperkennung durch die MAK vom Konformationszustand des hBD17-Peptids ist der Umstand, daß die im Immunoblot signalstärksten MAK L11-1b-C5 und

L11-1b-H11 in der ELISA-Untersuchung nur ein mittleres Signal verursachten (3.2.1). Im Rahmen der durchgeführten Western Blot-Analysen wurde das synthetische hBD17 vor dem Auftragen auf das Gel hitzedenaturiert und durch den Zusatz von DTT reduziert (Spaltung der Disulfidbrücken), sofern keine Untersuchungen über die Auswirkungen des Redox-Zustandes des Antigens beabsichtigt waren. Das Molekül sollte demzufolge in linearer Form vorliegen. Im Gegensatz dazu erfolgte in der ELISA- und Dot Blot-Analyse keine Denaturierung des Peptids. In diesem Zusammenhang postulieren RAMBUKKANA *et al.* (1992) die maßgebliche Abhängigkeit der Bindung eines MAK an ein bestimmtes Protein vom nativen oder denaturierten Zustand des Proteins. Die Autoren beschreiben für drei MAK gegen den Antigen-85-Komplex von Mycobakterien eine unterschiedliche Sensitivität im Western Blot, ELISA und Dot Blot und führen diese auf verschiedene Konformationszustände des Antigens im jeweiligen System und eine damit einhergehende, unterschiedliche Zugänglichkeit der einzelnen Epitope zurück. Die vorliegenden Ergebnisse deuten darauf hin, daß manche MAK ihre Epitope auf dem nativen Peptid, andere jedoch die Bindungsstellen auf dem denaturierten Molekül besser erkennen. Erstere müßten ein starkes Signal in der ELISA-Analyse verursachen, während die Zweitgenannten eine hohe Signalstärke im Western Blot hervorrufen sollten. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch DEN BLAAUWEEN *et al.* (1989) in einer Charakterisierung von 18 MAK gegen das Penicillin-Bindungsprotein 1B in *E. coli*, in der nur ein MAK das vollständig denaturierte Antigen erkannte. Die anderen MAK benötigten eine mehr oder minder ausgebildete Tertiärstruktur des Proteins, um an ihr Epitop binden zu können. Aus diesen Zusammenhängen wird deutlich, daß bei der Detektion des synthetischen Zielpeptids in der ELISA- und der Western Blot-Analyse unter Anwendung der generierten MAK gegen hBD17 keine Korrelation der Signalstärken in den beiden immunologischen Testsystemen gegeben war. Die Ursache dafür stellen vermutlich die unterschiedlichen, pufferbedingten Konformationen des Antigens dar. Eine Auswahl der für Western Blot-Untersuchungen am besten geeigneten MAK war folglich aufgrund der Resultate der ELISA-Experimente allein nicht möglich. Im Hinblick auf diese Verhältnisse wären korrelierende Signalstärken in der ELISA- und Dot Blot-Untersuchung zu erwarten gewesen, da in beiden Systemen keine Denaturierung des Antigens erfolgte und sich die Epitopregionen auf dem hBD17-Peptid demzufolge in ähnlicher räumlicher Anordnung befinden müßten. Eine solche Korrelation war jedoch nicht zu beobachten. Auch weitere Dot Blot-Analysen mit synthetischen hBD17 in unterschiedlichen vermuteten Konformationen (s.u.) ermöglichten keine Eingrenzung der hierfür wesentlichen Faktoren.

Die Dot Blot-Analyse ermöglicht prinzipiell einen höheren Probendurchsatz im Vergleich zum Western Blot. Zudem ist diese Methode weniger kostenintensiv, da keine Gelmatrix benötigt

wird. Aus diesen Gründen war zunächst beabsichtigt, die Aliquotsätze der Peptidbanken im Dot Blot-Verfahren auf immunologische Aktivitäten zu testen. Sowohl Western Blot als auch Dot Blot stellen bewährte Methoden zur Charakterisierung von MAK dar. Ein Vergleich der mit den 20 ausgewählten MAK erzielten Signalstärken in den beiden Testsystemen machte deutlich, daß die notwendige Vergleichbarkeit von Dot Blot und Western Blot bei der Verwendung der generierten Antikörper gegen hBD17 nicht gegeben war (s. 3.2.1), was in Anbetracht der oben angesprochenen vermuteten Konformationsunterschiede nicht erstaunlich ist. Im weiteren Verlauf der Experimente wurden ebenfalls Dot Blot-Untersuchungen mit denaturiertem und reduziertem hBD17 durchgeführt. Es konnten mit der Dot Blot-Methode jedoch, unabhängig vom nativen, denaturierten und/oder reduzierten Zustand des Antigens, keine konsistenten Signale erzielt werden (Abbildung 14). Möglicherweise nahm das reduzierte Molekül während des Bindungsvorgangs auf der Membran wieder eine gefaltete Konformation ein. Um diese Ursache auszuschließen, wurden Dot Blot-Analysen durchgeführt, in denen das synthetische hBD17 nach Hitzedenaturierung und DTT-Zusatz im selben Puffer auf die Membran gebunden wurde, der auch als Probenpuffer im Western Blot-Verfahren diente. Aufgrund der daraus resultierenden starken Hintergrundsignale war keine Unterscheidung von spezifischen, konzentrationsabhängigen Signalen möglich. Die Detektion von immunologischen Aktivitäten in den Fraktionen der Peptidbanken und in Fraktionen, die aus nachfolgenden Reinigungen resultierten, wurde deshalb mittels Western Blot-Analyse durchgeführt.

4.4 Der Redox-Zustand von hBD17 ist entscheidend für die Detektion in der Western Blot-Analyse

Zur Charakterisierung der generierten MAK in bezug auf ihre Sensitivität wurden verschiedene Mengen des synthetischen Antigens auf eine Membran geblottet und mit den jeweiligen Antikörpern inkubiert (2.3). Während der Experimente zeigte sich, daß der Redox-Zustand des Zielpeptids einen wesentlichen Einfluß auf die Nachweisgrenze im Immunoblot hatte. In der Western Blot-Analyse war eine deutlich geringere Menge des synthetischen Peptids in reduzierter Form detektierbar als in nicht reduzierter Form (3.2.1). In der Literatur wird unter "oxidativer Faltung" die Wiederherstellung der nativen Disulfidverbrückung und der nativen Konformation verstanden, während der umgekehrte Vorgang als "reduktive Entfaltung" bezeichnet wird (WEDEMEYER *et al.*, 2000). In dieser Bedeutung werden die Begriffe "reduziert" und "oxidiert" im folgenden benutzt. Zur Reduzierung des Peptids (Spaltung der Disulfidbrücken) wurden die Proben vor der Hitzedenaturierung mit 0,5 M DTT versetzt. Das in der Abteilung für Peptidsynthese der IPF PharmaCeuticals GmbH hergestellte Peptid wurde

jedoch keiner Faltung unterzogen; es sollte in linearer Form vorliegen und somit keine Disulfidbrücken aufweisen. Allerdings beeinflussen viele Faktoren die Faltung und Stabilität von Proteinen, wie hydrophobe Wechselwirkungen, van-der-Waals-Kräfte, elektrostatische Kräfte und Wasserstoffbrückenbindungen. Diese Faktoren sind noch nicht vollständig verstanden (IBRAGIMOVA und WADE, 1999).

In vivo wird die Faltung von Proteinen von zahlreichen akzessorischen Molekülen unterstützt (WU *et al.*, 2003). Die Arbeitsgruppe von WU untersuchte die Ausbildung von Disulfidbrücken und die damit zusammenhängende Faltung der Moleküle von hBD1, hBD2 und hBD3 *in vitro*. Sie setzten dazu die synthetischen Peptide verschiedenen oxidativen Bedingungen (DMSO, Luft, Cystein/Cystin) aus. WU *et al.* (2003) beobachteten, daß hBD3 nach der Luftoxidation in einem Guanidiniumhydrochlorid-haltigen Puffer in unterschiedlichen strukturellen Zuständen vorlag. WEDEMEYER *et al.* (2000) beschreiben eine Modellvorstellung, nach der ein cysteinverbrücktes Protein in der nativen Konformation unter bestimmten Bedingungen begünstigt ist, weil sich nicht native Strukturen sehr viel langsamer wieder anordnen können. Eine typische Reaktionsbedingung für eine Oxidation eines solchen Proteins ist ein pH-Wert über 8 (JAENICKE und RUDOLPH, 1989). Obwohl das eingesetzte synthetische hBD17 keinem Oxidationsmittel ausgesetzt wurde, erscheint vor diesem Hintergrund eine spontane oxidative Faltung des Peptides im alkalischen Probenaufnahmepuffer (pH 8,4) des eingesetzten NuPAGE-Systems als wahrscheinlich.

Die Abhängigkeit der Immunogenität des Antigens von der durch die Disulfidbrücken bestimmten Konformation des Moleküls konnte bereits häufiger beobachtet werden. MINTZ und MANN (1990) beschrieben für einen MAK gegen ein Fragment des Propeptides des humanen Prokollagens eine ausschließliche Bindung an die reduzierte Form des Antigens. Andere MAK benötigen intakte Disulfidbrücken zur Antigenerkennung (SPECKNER *et al.*, 2000), da diese wesentlich für die Vollständigkeit des Epitops sein können (OZYORUK *et al.*, 2001). Im Gegensatz dazu scheinen die ausgebildeten Cysteinbindungen von hBD17 bei der Epitoperkennung hinderlich zu sein, da das Peptid von den MAK in reduziertem Zustand in wesentlich geringeren Mengen als in der oxidierten Form detektiert wurde. Ähnliche Resultate schildern WAN *et al.* (1995) im Zusammenhang mit der Charakterisierung von MAK gegen den Bowman-Birk Protease Inhibitor (MW: 7.959 Da, 7 Disulfidbrücken): Von vier MAK wiesen drei MAK eine wesentlich höhere Reaktivität gegenüber dem reduzierten Antigen auf, während der vierte MAK das Antigen ausschließlich in nativer Form erkannte.

Die wesentliche Diskrepanz zwischen den Nachweisgrenzen des reduzierten bzw. nicht

reduzierten synthetischen hBD17 deutet auf strukturelle Unterschiede in der Epitopregion der jeweiligen Formen hin. Diese sind bei einem derart kleinen Molekül wohl nur durch Konformationsänderungen in der Tertiärstruktur zu erklären. Die vermutete oxidative Faltung des synthetischen hBD17-Peptids scheint die Bindung zwischen MAK und Epitop zu behindern. Solche strukturbedingten Inhibierungen der Epitoperkennung sind in der Literatur speziesübergreifend dokumentiert. So stellten AGAPOV *et al.* (1999) bei Toxizitätsuntersuchungen mit der A-Kette des Mistellektins fest, daß ein Epitop auf diesem Molekül erst nach der Spaltung einer Disulfidbrücke vom entsprechenden MAK erkannt werden konnte. Das humane Spermatozoen Antigen HE2 ist ein kleines, sekretorisches Glykopeptid, das ausschließlich im humanen Nebenhoden exprimiert wird und zwei Cysteine aufweist, die eine intramolekulare Disulfidbrücke bilden können. Immunhistochemische Untersuchungen von OSTERHOFF *et al.* (1994) mit polyklonalen Antikörpern gegen HE2 ergaben, daß die durch Immunisierungen von Kaninchen und Hühnern gewonnenen Antikörper das entsprechende Epitop nur in reduzierter Form erkannten.

Die Resultate der durchgeführten Versuche bestärken die Annahme, daß die Reduktion des synthetischen hBD17 durch DTT das Epitop dem Antikörper offensichtlich zugänglicher macht und somit die Antigenität des Peptids steigert. Eine Beteiligung von Disulfidbrücken bei dieser Konformationsänderung ist somit sehr wahrscheinlich. Die Daten sind dadurch erklärbar, daß das im Probenaufnahmepuffer gelöste synthetische hBD17 mindestens eine Disulfidbrücke ausgebildet hat. In Anbetracht des erwarteten niedrigen Gesamtgehalts an hBD17 wäre eine Detektion in den Peptidbanken somit vermutlich nur erfolgreich, wenn das Peptid denaturiert und reduziert vorliegt. Das Auftreten von Banden in der erwarteten Größe von ca. 4 kDa im Verlauf der durchgeführten Versuche deutet auf eine Reduktion des nativen hBD17 während der Probenvorbereitung und eine Epitoperkennung auf dem natürlichen Defensin durch den spezifischen MAK hin. Unter der Voraussetzung, daß die beobachteten Banden nicht von einer Antikörperbindung an die isolierten Peptidfragmente (SGII und HUSI-II) verursacht wurden, sollte der Antikörper L11-1b-C5 demzufolge ein geeignetes Werkzeug für die Aufreinigung von hBD17 aus Gewebepeptidbanken darstellen.

4.5 Aufreinigung von immunreaktiven Peptiden aus der humanen Ejakulat-Peptidbank

Die Resultate der immunhistochemischen Experimente (3.2.2) deuten auf eine Sekretion von hBD17 aus den epididymalen Epithelzellen in die Seminalflüssigkeit hin. Aus diesem Grund

schien humanes Ejakulat eine vielversprechende Quelle für die Isolierung von hBD17 zu sein. Die zunächst für die Aufreinigungen verwendete Peptidbank wurde aus 130 ml Ejakulat generiert. Die Trennung der Bestandteile der Ursprungsfraction 22 über zwei Reverse Phase-Chromatographien im analytischen Maßstab führte zur Isolierung eines Fragments des Semenogelin II Vorläuferproteins (SGII) (3.3.3). Das gesamte Polypeptid besteht aus 559 Aminosäuren und hat ein MG von 63 kDa (LILJA und LUNDWALL, 1992). Die Semenogeline werden von der Samenblase sekretiert und bilden den mengenmäßig größten Anteil der gelbildenden Proteine im Ejakulat (ULVSBACK *et al.*, 1992). Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen des reifen Zielpeptids und der gelesenen Sequenz von SGII belegte eine Übereinstimmung von lediglich 7,1 % (s. Abbildung 24). Eine Erkennung einer Epitopregion auf dem SGII-Fragment durch den spezifischen Antikörper ist somit sehr unwahrscheinlich. Denkbar ist, daß der MAK L11-1b-C5 unspezifisch aufgrund der hohen Abundanz des SGII-Fragments an dieses gebunden hat. Eine weitere Möglichkeit ist, daß das eigentliche Antigen in der sequenzierten Probe mengenmäßig unterrepräsentiert oder chemisch blockiert war, so daß nur die überlagernde Sequenz des weniger oder nicht antigenen SGII-Fragments detektiert werden konnte.

Um eine Trennung des SGII-Fragments vom putativen antigenen Bestandteil der immunreaktiven Fraktion des Aufreinigungsschritts 2a zu erzielen, wurden 50 % der Fraktion 30 des genannten Rechromatographielaufs zunächst auf einer Kationen-Austausch-Säule getrennt (3.3.4). Die beiden Fraktionen mit den höchsten Signalstärken im immunologischen Test wurden vereinigt und einer Reverse Phase-Chromatographie unterzogen. Eine Kapillarzonenlektrophorese mit einem Teil der immunreaktivsten Fraktion belegte das Vorhandensein von mindestens drei Komponenten mit unterschiedlichen Ladungen in dieser Fraktion. Die durch die Sequenzierung eines Aliquots der genannten Fraktion ermittelte Aminosäurefolge entsprach der Sequenz eines Fragments des Acrosin-Trypsin Inhibitor II Vorläuferproteins (HUSI-II). Andere Sequenzen konnten in der Probe nicht gelesen werden (3.3.5). HUSI-II ist ein säurestabiler Proteinaseinhibitor mit einem MG von etwa 6,5 kDa (SCHIESSLER *et al.*, 1976). Der Inhibitor ist sowohl im humanen Seminalplasma (MÖRITZ *et al.*, 1991), als auch in den Spermatozoen in der Nähe des Akrosoms gefunden worden (DIETL *et al.*, 1976). Seine vermutliche physiologische Funktion ist die Hemmung des Abbaus von Proteinen durch das von den Spermatozoen freigesetzte Acrosin; das Polypeptid wird im Hoden, im Nebenhoden und in der Samenblase synthetisiert (MÖRITZ *et al.*, 1991). Eine spezifische Bindung des MAK L11-1b-C5 an eine als Epitop erkannte Region des HUSI-II-Fragments erscheint aufgrund der unähnlichen Aminosäurefolgen von hBD17 und dem genannten

Fragment (Übereinstimmung: 14,9 %, s. Abbildung 27) als nicht wahrscheinlich. Eine unspezifische Bindung des MAK an das HUSI-II-Fragment könnte die Ursache für die immunologischen Signale in den entsprechenden Fraktionen sein. Möglicherweise wurde die Immunreaktivität aber auch durch einen anderen Bestandteil der Fraktionen hervorgerufen, von denen es nach den Resultaten der Kapillarzonelektrophorese wenigstens zwei geben mußte. Diese Komponenten der Fraktionen waren jedoch mit chromatographischen Methoden nicht weiter separierbar; das putative eigentliche Antigen konnte daher nicht isoliert werden.

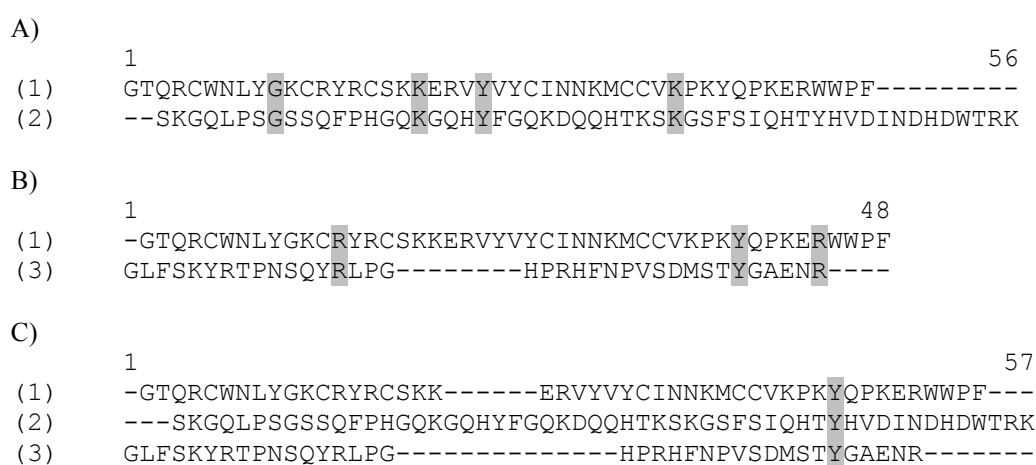


Abbildung 33: Vergleich der Aminosäurefolgen von A) reifem hBD17-Peptid (1) und Semenogelin II Vorläuferprotein (2), B) reifem hBD17-Peptid (1) und Acrosin-Trypsin Inhibitor II Vorläuferprotein und C) allen drei Sequenzen. Identische Aminosäuren sind grau unterlegt.

4.6 Reproduzierbarkeit der immunologischen Signale in den später hergestellten Sperma-Peptidbanken

Aufgrund der bisher erzielten Resultate konnte nicht ausgeschlossen werden, daß die Menge des in der aus 130 ml Ejakulat generierten Peptidbank enthaltenen hBD17 für eine Isolierung nicht ausreichend sein könnte. Ausgehend von einer Konzentration des Zielpeptids von ca. 200 ng/ml Gewebeäquivalent (TEQ) in den Ursprungsfraktionen der Peptidbank mit den höchsten Signalstärken (Fraktion 22 und 25 im pH-Pool 4) wäre in der gesamten Peptidbank eine Gesamtmenge an hBD17 von etwa 52 µg zu erwarten. Bei einer chromatographischen Aufreinigung über zwei Stufen traten Verluste von 40 bis 60 % der ursprünglichen Signalstärke im immunologischen Test auf. Der Vergleich der densitometrischen Auswertungen läßt auf einen Gehalt von ca. 50 ng an immunreaktiven Bestandteilen in einem 50 µl Aliquot einer 180 µl umfassenden Eluatfraktion schließen. Diese Menge entspricht etwa 25 pmol und liegt damit nur

unwesentlich über der Nachweisgrenze der Sequenzierung von etwa 10 pmol. Auch nach zwei Trennungsschritten scheint das Zielpeptid somit durch wesentlich abundantere Komponenten der immunreaktiven Fraktionen überlagert worden zu sein, sofern keine Kreuzreaktivität des MAK vorlag.

Um genügend Material für weitere Aufreinigungsstrategien zur Verfügung zu haben, wurden Peptidbanken aus 280 ml humanem Ejakulat hergestellt. Dazu wurden zunächst Spermatozoen und Seminalplasma getrennt (3.3), um bei einer erfolgreichen Aufreinigung den Ursprung des Zielpeptids bestimmen zu können. Die Herstellung dieser Peptidbanken erfolgte, von der vorausgehenden Trennung von Spermatozoen und Seminalflüssigkeit abgesehen, nach exakt demselben Verfahren wie die Generierung der ursprünglichen Peptidbank aus 130 ml humanem Ejakulat. Dennoch konnten in den neuen Peptidbanken keine reproduzierbaren immunologischen Signale detektiert werden. BALS *et al.* (1998) beschrieben eine schwache Expression von hBD2 in humanem Hoden. Diese Ergebnisse konnten COM *et al.* (2003) nicht reproduzieren. Die Autoren vermuten, daß BALS *et al.* entzündete Gewebeproben analysierten und deshalb eine Expression des induzierbaren hBD2-Peptids nachweisen konnten. Ein erheblicher Anteil (ca. 50 ml) der für die Herstellung der Peptidbank aus 130 ml Ejakulat verwendeten Proben stammte von einem Spender, während die beiden neuen Peptidbanken aus den Proben vieler Spender generiert wurden. Denkbar wäre eine durch inflammatorische Zustände im Urogenitaltrakt des besagten Spenders induzierte Expression von hBD17. Dadurch, daß das Sperma eines Spenders in der verarbeiteten Gesamtmenge an Ejakulat so stark repräsentiert war, kann eine entzündungsinduzierte Expression des Zielpeptides als Ursache der detektierten immunologischen Signale nicht ausgeschlossen werden. Dieser Sachverhalt würde die Absenz von immunreaktiven Fraktionen in den nachfolgend erstellten Peptidbanken erklären. Die für den immunhistochemischen Nachweis von hBD17 verwendeten Gewebeschnitte wurden aus Nebenhoden von Patienten mit testikulären Tumoren präpariert. Das gilt auch für die von RODRIGUEZ-JIMENEZ (2003) zur Expressionsanalyse verwendeten Gewebeproben. COPE *et al.* (1999) wiesen in testikulärem Gewebe von an Hodenkrebs erkrankten Patienten zahlreiche inflammatorische Faktoren (u.a. CD20, CD21, CD68) nach. Eine Hochregulierung von inflammatorischen Faktoren in den Gewebeproben, die für die Immunhistochemie in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden, ist ebenfalls durchaus möglich. Somit könnte die spezifische Immunfärbung in den Nebenhodenschnitten auch aus einer entzündungsinduzierten Expression von hBD17 resultieren.

4.7 In unbehandeltem Ejakulat konnten immunologische Signale detektiert werden

Um die Hypothese der entzündungsinduzierten Expression von hBD17 zu überprüfen, wurden Aliquots aus den vereinigten Ejakulatproben von sechs Spendern elektrophoretisch aufgetrennt und im Immunoblot getestet. Es handelte sich um gesunde Spender, die sich nicht in urologischer Behandlung befanden; alle Spender waren zu etwa gleichen Teilen in der Gesamtmenge der Proben repräsentiert. Auf Entzündungsvorgängen beruhende, immunologische Signale konnten dadurch weitestgehend ausgeschlossen werden. So sollte festgestellt werden, ob im Gesamtejakulat mittels des spezifischen MAK eine Immunreaktivität entdeckt werden konnte.

Tatsächlich traten im immunologischen Test von Gesamtspermaproben in unterschiedlichen Verdünnungen konzentrationsabhängige, reproduzierbare Signale auf. Die entsprechenden Bandenmuster befanden sich jedoch nicht auf der erwarteten Höhe von ca. 4 kDa, sondern konnten anhand des aufgetragenen Größenstandards einer Höhe von etwa 30 kDa zugeordnet werden. Für einige Proteine konnte eine Aggregation in Anwesenheit von SDS nachgewiesen werden (HELENIUS und SIMONS, 1972; DOHNAL *et al.*, 1980), und auch SDS-stabile Peptid-Protein-Komplexe sind für Vertebraten beschrieben (SCOTT *et al.*, 1999). HAMILTON *et al.* (2002) fanden in *Stomoxys calcitrans* einen SDS-stabilen Komplex aus Defensinen, die im Mitteldarm exprimiert werden (Smd1 und Smd2), und aus einem ca. 26 kDa großen Protein, das zur Familie der Serinproteinasen gehört. In der von den Autoren durchgeführten Western Blot-Analyse verursachte dieser Komplex eine Bande in einer Höhe von 26 kDa, hingegen war eine Bande in der erwarteten Höhe von 4 kDa nicht detektierbar. Ein Zusatz von rekombinantem Smd1 führte zu einem Anstieg des Molekulargewichts der Bande, was HAMILTON *et al.* (2002) als Beleg für die Existenz des genannten Komplexes werten. Im experimentellen Teil dieser Arbeit wurden die einzelnen Verdünnungsstufen des Gesamtejakulats mit jeweils 30 ng synthetischem hBD17 versetzt und im Immunoblot getestet. Das Resultat war ein Auftreten von Banden einer Größe von 4 kDa (entsprechend den durch das synthetische Peptid hervorgerufenen Banden) und es kam zu keiner Verschiebung der immunreaktiven Banden in Höhe von ca. 30 kDa. Dieser Sachverhalt spricht gegen die Ausbildung eines SDS-stabilen hBD17-Protein-Komplexes in den Gesamtspermaproben. Wahrscheinlich ist, daß die unerwartet hohe Bande entweder durch posttranslationale Modifikationen (z.B. Glykosylierung) oder durch eine Kreuzreaktivität des MAK hervorgerufen wurde.

PERRY *et al.* (1999) beschreiben im Zusammenhang mit der Charakterisierung des Proteins ESP13.2 das Auftreten einer spezifischen Bande von einer Höhe von ca. 30 kDa im Western Blot. ESP13.2 ist ein im Nebenhoden von *Macaca fascicularis* sekretiertes Protein, das ein Homolog zum humanen Defensin hBD31 darstellt und ein theoretisches MG von 13,2 kDa aufweist. Die Diskrepanz zwischen tatsächlich gefundener Bande und theoretischer Größe des Moleküls führen die Autoren auf posttranslationale Modifikationen zurück. Allerdings fehlen dem ESP13.2-Protein Glykosylierungsstellen, weshalb PERRY *et al.* (1999) eine Addition von Zuckern über ein Sauerstoffatom an die Serin- und Threoninreste als Modifikation des Moleküls vermuten. In Anbetracht der Tatsache, daß die Aminosäurefolge des reifen hBD17-Peptids nur jeweils einen Serin- bzw. Threoninrest beinhaltet, erscheint eine derartige posttranslationale Modifikation als Ursache für die unerwartete Höhe der im Gesamtejakulat detektierten Bande als nicht wahrscheinlich.

Zur Verfolgung der im Gesamtsperma gefundenen Immunaktivität wurde der MAK L11-1b-C5 an das Bettmaterial einer Protein A-Säule gekoppelt, um die immunreaktiven Komponenten aus einer adäquaten Menge an Ejakulat mittels Immunaффinitätschromatographie isolieren zu können (3.5). Aus den affinitätschromatographischen Aufreinigungen der vereinigten Ejakulatproben von acht verschiedenen Spendern resultierten jedoch keine immunologisch aktiven Eluate. Es ist daher davon auszugehen, daß die gefundene Immunaktivität im Gesamtsperma auf einer Kreuzreaktivität der MAK beruht. Diese Annahme deckt sich auch mit der Tatsache, daß in den aus Seminalflüssigkeit und Spermatozoen hergestellten Peptidbanken keine reproduzierbaren immunologischen Signale detektiert werden konnten. Eine durch inflammatorische Faktoren induzierte Expression von hBD17 im humanen Nebenhoden ist in Anbetracht der Resultate naheliegend.

4.8 Ausblick

In den letzten Jahren hat der Bedarf an Impfstoffen gegen eine Vielzahl sexuell übertragbarer Krankheiten, an Methoden zur Behandlung von unfruchtbaren Männern und an Möglichkeiten zur alternativen Empfängnisverhütung das Interesse der Forschung auf die Immunologie des männlichen Reproduktionstrakts gelenkt (BEAGLEY *et al.*, 1998). Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse deuten darauf hin, daß hBD17 keinen direkten Einfluß auf die Maturation der Spermatozoen hat und darum als potientiellles Mittel zur Behandlung von Infertilität und zur Empfängnisverhütung nicht geeignet ist. Die durch die Versuchsergebnisse gestützte Annahme, daß die Expression von hBD17 inflammatorisch induziert ist, läßt ein hohes antimikrobielles Potential des Zielpeptids vermuten.

Die Ergebnisse neuerer Arbeiten weisen darauf hin, daß antimikrobielle Peptide neben ihrer grundsätzlichen Funktion in der Immunabwehr von Säugern (GALLO und NIZET, 2003) weitergehende Funktionen bei der Regulation der Immunantwort haben könnten. Damit stellen diese vermutlich sowohl einen wichtigen Teil der angeborenen Immunabwehr als auch ein Bindeglied zwischen angeborener und adaptiver Immunantwort dar (HANCOCK und SCOTT, 2000). Für verschiedene antimikrobielle Peptide ist auch eine Bindung von bakteriellem LPS und damit ein Einfluß auf die Signalkaskade bei inflammatorischen Zuständen belegt (SCOTT *et al.*, 2000). Für eine fundierte Untersuchung, ob hBD17 auf solche oder ähnliche Vorgänge einen Einfluß hat, ist die Darstellung der nativen Form des Peptids vermutlich unabdingbar. Eine Isolierung von hBD17 aus Seminalflüssigkeit, die aus entzündeten Nebenhoden gewonnen wurde, erscheint theoretisch vielversprechend, ist aber praktisch kaum durchführbar. Erfolgversprechend könnte eine Aufreinigung des Zielpeptids aus *Epididymis*-Gewebe sein, das wie die für die Immunhistochemie verwendeten Proben von Patienten mit testikulären Tumoren stammt. Allerdings ist das Erlangen einer ausreichenden Menge des entsprechenden Gewebes naturgemäß schwierig.

Eine funktionelle Charakterisierung von hBD17, die über die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse hinausgeht, erscheint im Hinblick auf eine mögliche klinische Anwendung geboten. Vor dem Hintergrund der wesentlichen Abhängigkeit der biologischen Aktivität von der nativen Peptidform sollte die Isolierung von hBD17 in der nativen Konformation im Fokus weitergehender Studien liegen, um die biologischen Funktionen dieses Defensins möglichst vollständig aufklären zu können.

5 Zusammenfassung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Charakterisierung des neuen humanen β -Defensins hBD17 in bezug auf immunmodulatorische und gewebespezifische Expression sowie mögliche Konformationszustände des Moleküls und deren Einfluß auf eine Antikörperbindung. Weiterhin war eine Isolierung der nativen Form bzw. *in vitro* Translation des Peptids beabsichtigt, um die native Struktur und das Verbrückungsmuster des Defensins aufklären zu können. Zu diesem Zweck wurde eine Vielzahl von monoklonalen Antikörpern gegen hBD17 hergestellt und in verschiedenen immunologischen Verfahren auf ihre Sensitivität und Spezifität gegenüber dem synthetischen hBD17-Peptid getestet. Es zeigte sich, daß die Antikörperbindung stark von Konformation und Redoxzustand des Antigens abhängig war. Eine Auswahl der am besten geeigneten Antikörper wurde zur immunhistochemischen Detektion, zur Aufreinigung aus Gewebepeptidbanken und zur strukturellen Charakterisierung des Moleküls verwendet.

In vorangegangenen Expressionsanalysen wurde im humanen Nebenhoden die höchste Anzahl an hBD17-Transkripten von 28 untersuchten verschiedenen Geweben nachgewiesen. Daher wurde eine immunhistologische Detektion von hBD17 mit dem am besten geeigneten monoklonalen Antikörper in der *Epididymis* durchgeführt. Basierend auf der intrazellulären und segmentspezifischen Lokalisation des Moleküls wurden mögliche physiologische Funktionen des Defensins neben der antimikrobiellen Wirkung diskutiert. Die gewonnenen Erkenntnisse wiesen auf humanes Ejakulat als geeignete Quelle zur Aufreinigung des nativen Defensins hin.

In einer Gewebepeptidbank aus 130 ml Ejakulat konnten immunologische Signale identifiziert werden, deren Verfolgung letztlich zur Isolierung von zwei Proteinfragmenten führte, deren Aminosäuresequenzen nur eine sehr geringe Homologie zur Sequenz von hBD17 aufweisen. Eine spezifische Antikörperbindung an diese Fragmente erschien somit als nicht wahrscheinlich. Da für weitere Aufreinigungsversuche keine ausreichende Materialmenge aus den immunreaktiven Fraktionen zur Verfügung stand, wurden zwei neue Peptidbanken aus den Spermatozoen und der Seminalflüssigkeit von 280 ml Ejakulat hergestellt. In den Fraktionen dieser Gewebepanken konnten jedoch keine reproduzierbaren immunologischen Signale detektiert werden. Diese Resultate legen eine induzierte Expression von hBD17 im Zusammenhang mit inflammatorischen Zuständen im Urogenitaltrakt nahe. Da die biologische Aktivität stark von der Molekülstruktur abhängt, ist für eine funktionelle Charakterisierung des Defensins die Kenntnis der nativen Peptidform entscheidend.

6 Literaturverzeichnis

- ABOU-HAILA, A., TULSIANI, D.R. (2000) Mammalian sperm acrosome: formation, contents, and function. *Arch. Biochem. Biophys.* **379**(2), 173-82.
- AGAPOV, I.I., TONEVITSKY, A.G., MOYSENOVICH, M.M., MALUCHENKO, N.V., WEYHENMEYER, R., KIRPICHNIKOV, M.P. (1999) Mistletoe lectin dissociates into catalytic and binding subunits before translocation across the membrane to the cytoplasm. *FEBS Lett.* **452**(3), 211-4.
- ALTSCHUL, S.F., MADDEN, T.L., SCHAFFER, A.A., ZHANG, J., ZHANG, Z., MILLER, W., LIPMAN, D.J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**, 3389-402.
- BALS R. (2000) Epithelial antimicrobial peptides in host defense against infection. *Respir. Res.* **1**(3), 141-50.
- BALS, R. (2000) Antimikrobielle Peptide und Peptidantibiotika. *Med. Klin.* **95**, 496–502.
- BALS, R., GOLDMAN, M.J., WILSON, J.M. (1998) Mouse beta-defensin 1 is a salt-sensitive antimicrobial peptide present in epithelia of the lung and urogenital tract. *Infect. Immun.* **66**(3), 1225-32.
- BALS, R., LANG, C., WEINER, D.J., VOGELMEIER, C., WELSCH, U., WILSON, J.M. (2001) Rhesus monkey (*Macaca mulatta*) mucosal antimicrobial peptides are close homologues of human molecules. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **8**(2), 370-5.
- BALS, R., WANG, X., WU, Z., FREEMAN, T., BAFNA, V., ZASLOFF, M., WILSON, J.M. (1998) Human beta-defensin 2 is a salt-sensitive peptide antibiotic expressed in human lung. *J. Clin. Invest.* **102**(5), 874-80.
- BAUER, F., SCHWEIMER, K., KLUVER, E., CONEJO-GARCIA, J.R., FORSSMANN, W.G., ROSCH, P., ADERMANN, K., STICHT, H. (2001) Structure determination of human and murine beta-defensins reveals structural conservation in the absence of significant sequence similarity. *Protein Sci.* **10**(12), 2470-9.
- BAXTER, H. C., FRASER, J. R., LIU, W.-G., FORSTER, J. L., CLOKIE, S., STEINACKER, P., OTTO, M., BAHN, E., WILTFANG, J., AITKEN, A. (2002) Specific 14-3-3 isoform detection and immunolocalization in prion diseases. *Biochemical Society Transactions* **30**(4).
- BEAGLEY, K.W., WU, Z.L., POMERING, M., JONES, R.C. (1998) Immune responses in the epididymis: implications for immunocontraception. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* **53**, 235-45.
- BENSCH, K.W., RAID, M., MAGERT, H.J., SCHULZ-KNAPPE, P., FORSSMANN, W.G. (1995) hBD-1: a novel beta-defensin from human plasma. *FEBS Lett.* **368**, 331-5.
- BIRNBOIM, H.C., DOLY, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**, 1513-22.

- BRADFORD, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-54.
- CARRAWAY, K.L., KOSHLAND, D.E. JR. (1968) Reaction of tyrosine residues in proteins with carbodiimide reagents. *Biochim. Biophys. Acta.* **160**(2), 272-4.
- CHAN, Y.R., GALLO, R.L. (1998) PR-39, a syndecan-inducing antimicrobial peptide, binds and affects p130(Cas). *J. Biol. Chem.* **273**(44), 28978-85.
- CHERNYSH, S., KIM, S.I., BEKKER, G., PLESKACH, V.A., FILATOVA, N.A., ANIKIN, V.B., PLATONOV, V.G., BULET, P. (2002) Antiviral and antitumor peptides from insects. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **99**(20), 12628-32.
- CHERTOV, O., MICHIEL, D.F., XU, L., WANG, J.M., TANI, K., MURPHY, W.J., LONGO, D.L., TAUB, D.D., OPPENHEIM, J.J. (1996) Identification of defensin-1, defensin-2, and CAP37/azurocidin as T-cell chemoattractant proteins released from interleukin-8-stimulated neutrophils. *J. Biol. Chem.* **271**(6), 2935-40.
- CHILDS, G., UNABIA, G. (1982) Application of the avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) method to the light microscopic localization of pituitary hormones. *J. Histochem. Cytochem.* **30**(7), 713-6.
- COM, E., BOURGEON, F., EVRARD, B., GANZ, T., COLLEU, D., JEGOU, B., PINEAU, C. (2003) Expression of antimicrobial defensins in the male reproductive tract of rats, mice, and humans. *Biol. Reprod.* **68**(1), 95-104.
- COPE, N.J., MCCULLAGH, P., SARSFIELD, P.T. (1999) Tumour responding accessory cells in testicular seminoma: an immunohistochemical study. *Histopathology* **34**(6), 510-6.
- CORNWALL, G.A., HANN, S.R. (1995) Specialized gene expression in the epididymis. *J. Androl.* **16**, 379-83.
- D'CRUZ, O. J., PEREIRA, H. A., HAAS JR., G. G. (1995) Sperm immobilizing activity of a synthetic bioactive peptide 20-44 of 37-kDa cationic antimicrobial protein (CAP37) of human neutrophils. *J. Androl.* **16**(5), 432-40.
- DEN BLAAUWEN, T., WIENTJES, F.B., KOLK, A.H., SPRATT, B.G., NANNINGA, N. (1989) Preparation and characterization of monoclonal antibodies against native membrane-bound penicillin-binding protein 1B of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **171**(3), 1394-401.
- DIAMOND, G., ZASLOFF, M., ECK, H., BRASSEUR, M., MALOY, W.L., BEVINS, C.L. (1991) Tracheal antimicrobial peptide, a cysteine-rich peptide from mammalian tracheal mucosa: peptide isolation and cloning of a cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 3952-6.
- DIETL, T., KRUCK, J., SCHILL, W.B., FRITZ, H. (1976) Localization of seminal plasma proteinase inhibitors in human spermatozoa as revealed by the indirect immunofluorescence technique. *Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem.* **357**(10), 1333-7.

- DOHNAL, J.C., POTEPA, L.A., GARVIN, J.E. (1980) The molecular weights of three forms of glycophorin A in sodium dodecyl sulfate solution. *Biochim. Biophys. Acta.* **621**(2), 255-64.
- FELLERMANN, K., STANGE, E.F. (2001) Defensins-innate immunity at the epithelial frontier. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* **13**(7), 771-6.
- FITZGERALD, D.H., COLEMAN, D.C., O'CONNELL, B.C. (2003) Susceptibility of *Candida dubliniensis* to salivary histatin 3. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**(1), 70-6.
- FORNES, M.W., BARBIERI, A., SOSA, M.A., BERTINI, F. (1991) First observations on enzymatic activity and protein content of vesicles separated from rat epididymal fluid. *Andrologia* **23**(5), 347-51.
- FRÖHLICH, O., PO, C., YOUNG, L.G. (2001) Organization of the human gene encoding the epididymis-specific EP2 protein variants and its relationship to defensin genes. *Biol. Reprod.* **64**, 1072-9.
- FROHM NILSSON, M., SANDSTEDT, B., SORESEN, O., WEBER, G., BORREGAARD, N., STAHLBACKDAHL, M. (1999) The human cationic antimicrobial protein (hCAP18), a peptide antibiotic, is widely expressed in human squamous epithelia and colocalizes with interleukin-6. *Infect. Immun.* **67**(5), 2561-6.
- FROHM, M., AGERBERTH, B., AHANGARI, G., STAHLBACKDAHL, M., LIDEN, S., WIGZELL, H., GUDMUNDSSON, G.H. (1997) The expression of the gene coding for the antibacterial peptide LL-37 is induced in human keratinocytes during inflammatory disorders. *J. Biol. Chem.* **272**(24), 15258-63.
- GALLO, R.L., NIZET, V. (2003) Endogenous production of antimicrobial peptides in innate immunity and human disease. *Curr. Allergy Asthma Rep.* **3**(5), 402-9.
- GANZ, T. (1999) Enhanced: Defensins and Host Defense, *Science* **286**, 420-1.
- GARCIA, J.R., JAUMANN, F., SCHULZ, S., KRAUSE, A., RODRIGUEZ-JIMENEZ, J., FORSSMANN, U., ADERMANN, K., KLUVER, E., VOGELMEIER, C., BECKER, D., HEDRICH, R., FORSSMANN, W.G., BALS, R. (2001a) Identification of a novel, multifunctional beta-defensin (human beta-defensin 3) with specific antimicrobial activity. Its interaction with plasma membranes of *Xenopus* oocytes and the induction of macrophage chemoattraction. *Cell Tissue Res.* **306**, 257-64.
- GARCIA, JR., KRAUSE, A., SCHULZ, S., RODRIGUEZ-JIMENEZ, F.J., KLUVER, E., ADERMANN, K., FORSSMANN, U., FRIMPONG-BOATENG, A., BALS, R., FORSSMANN, W.G. (2001b) Human beta-defensin 4: a novel inducible peptide with a specific salt-sensitive spectrum of antimicrobial activity. *FASEB J.* **15**, 1819-21.
- GIGLIONE, C., MEINDEL, M. (1992) The situation on antimicrobial agents and chemotherapy in 2002: Highlights of the 42nd ICAAC. *Expert Opin. Ther. Targets* **6**(6).
- GLICK, B.S., MALHOTRA, V. (1998) The curious status of the Golgi apparatus. *Cell* **95**, 883-9.
- GOODFRIEND, T.L., LEVINE L., FASMAN G.D. (1964) Antibodies to bradykinin and angiotensin: A use of carbodiimides in immunology. *Science* **144**, 1344-6.

- GOUGH, M., HANCOCK, R.E., KELLY, N.M. (1996) Antiendotoxin activity of cationic peptide antimicrobial agents. *Infect. Immun.* **64**(12), 4922-7.
- GRENS, A., SCHEFFLER, I.E. (1990) The 5'- and 3'-untranslated regions of ornithine decarboxylase mRNA affect the translational efficiency. *J. Biol. Chem.* **265**(20), 11810-6.
- GUAN, K.L., WEINER, H. (1989) Influence of the 5'-end region of aldehyde dehydrogenase mRNA on translational efficiency. Potential secondary structure inhibition of translation in vitro. *J. Biol. Chem.* **264**(30), 17764-9.
- GUDMUNDSSON, G.H., AGERBERTH, B., ODEBERG, J., BERGMAN, T., OLSSON, B., SALCEDO, R. (1996) The human gene FALL39 and processing of the cathelin precursor to the antibacterial peptide LL-37 in granulocytes. *Eur. J. Biochem.* **238**(2), 325-32.
- GUTTMAN, A. (1996) Capillary sodium dodecyl sulfate-gel electrophoresis of proteins. *Electrophoresis* **17**(8), 1333-41.
- GUZMÁN-VERRI, C., MANTEROLA, L., SOLA-LANDA, A., PARRA, A., CLOECKAERT, A., GARIN, J., GORVEL, J.-P., MORIYÓN, I., MORENO, E., LÓPEZ-GOÑI, I. (2002) The two-component system BvrR/BvrS essential for *Brucella abortus* virulence regulates the expression of outer membrane proteins with counterparts in members of the Rhizobiaceae. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**(19), 12375-80.
- HAMIL, K.G., LIU, Q., SIVASHANMUGAM, P., ANBALAGAN, M., YENUGU, S., SOUNDARARAJAN, R., GROSSMAN, G., RAO, A., BIRSE, C.E., RUBEN, S.M., RICHARDSON, R.T., ZHANG, Y.L., O'RAND, M.G., PETRUSZ, P., FRENCH, F.S., HALL, S.H. (2003) LCN6, a novel human epididymal lipocalin. *Reprod. Biol. Endocrinol.* **1**(1), 112.
- HAMIL, K.G., LIU, Q., SIVASHANMUGAM, P., YENUGU, S., SOUNDARARAJAN, R., GROSSMAN, G., RICHARDSON, R.T., ZHANG, Y.L., O'RAND, M.G., PETRUSZ, P., FRENCH, F.S., HALL, S.H. (2002) Cystatin 11: a new member of the cystatin type 2 family. *Endocrinology* **143**(7), 2787-96.
- HAMIL, K.G., SIVASHANMUGAM, P., RICHARDSON, R.T., GROSSMAN, G., RUBEN, S.M., MOHLER, J.L., PETRUSZ, P., O'RAND, M.G., FRENCH, F.S., HALL, S.H. (2000) HE2beta and HE2gamma, new members of an epididymis-specific family of androgen-regulated proteins in the human. *Endocrinology* **141**(3), 1245-53.
- HAMILTON, J.V., MUNKS, R.J., LEHANE, S.M., LEHANE, M.J. (2002) Association of midgut defensin with a novel serine protease in the blood-sucking fly *Stomoxys calcitrans*. *Insect. Mol. Biol.* **11**(3), 197-205.
- HAMILTON, P. (1990) Sperm banking before chemotherapy or radiotherapy for cancer. *N. Engl. J. Med.* **322**, 1822.
- HANCOCK R.E., LEHRER R., (1998) Cationic peptides: a new source of antibiotics. *Trends Biotechnol.* **16**, 82-8.
- HANCOCK, R.E. (2000) Cationic antimicrobial peptides: towards clinical applications. *Exp. Opin. Invest. Drugs* **9**, 1723-8.
- HANCOCK, R.E., CHAPPLE, D.S. (1999) Peptide antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**(6), 1317-23.

- HANCOCK, R.E., SCOTT, M.G. (2000) The role of antimicrobial peptides in animal defenses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**(16), 8856-61.
- HARDER, J., BARTELS, J., CHRISTOPHERS, E., SCHRODER, J.M. (1997) A peptide antibiotic from human skin. *Nature* **387**, 861.
- HARDER, J., BARTELS, J., CHRISTOPHERS, E., SCHRODER, J.M. (2001) Isolation and characterization of human beta -defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic. *J. Biol. Chem.* **276**(8), 5707-13.
- HECKERT, R.A., MCNAB, W.B., RICHARDSON, S.M., BRISCOE, M.R. (1992) Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibodies to caprine arthritis-encephalitis virus in goat serum. *Can. J. Vet. Res.* **56**(3), 237-41.
- HELENIUS, A., SIMONS, K. (1972) The binding of detergents to lipophilic and hydrophilic proteins. *J. Biol. Chem.* **247**(11), 3656-61.
- IBRAGIMOVA, G.T., WADE, R.C. (1999) Stability of the beta-sheet of the WW domain: A molecular dynamics simulation study. *Biophys. J.* **77**(4), 2191-8.
- ILIO, K.Y., HESS, R.A. (1994) Structure and function of the ductuli efferentes: a review. *Microsc. Res. Tech.* **29**(6), 432-67.
- JAENICKE, R., RUDOLPH, R. (1989) Folding proteins. In: *Protein Structure, A Practical Approach* (Creighton, T.E., ed.) pp 191-223, IRL-Press, Oxford, New York, Tokyo.
- KAISER, V., DIAMOND, G. (2000) Expression of mammalian defensin genes. *J. Leukoc. Biol.* **68**, 779-84.
- KAMYSZ, W., OKROJ, M., LUKASIAK, J. (2003) Novel properties of antimicrobial peptides. *Acta Biochim. Pol.* **50**(2), 461-9.
- KEARNEY, J.F., RADBRUCH, A., LIESEGANG, B., RAJEWSKY, K. (1979) A new mouse myeloma cell line that has lost immunoglobulin expression but permits the construction of antibody-secreting hybrid cell lines. *J. Immunol.* **123**(4), 1548-50.
- KING, D. (2002) <http://www.siumed.edu/~dking2/erg/epidid.htm>.
- KIRCHHOFF, C. (1998) Molecular characterization of epididymal proteins. *Rev. Reprod.* **3**(2), 86-95.
- KIRCHHOFF, C. (1999) Gene expression in the epididymis. *Int. Rev. Cytol.* **188**, 133-202.
- KIRCHHOFF, C., OSTERHOFF, C., HABBEN, I., IVELL, R., KIRCHLOFF, C. (1990) Cloning and analysis of mRNAs expressed specifically in the human epididymis. *Int. J. Androl.* **13**(2), 155-67.
- KOCZULLA, R., VON DEGENFELD, G., KUPATT, C., KROTZ, F., ZAHLER, S., GLOE, T., ISSBRUCKER, K., UNTERBERGER, P., ZAIU, M., LEBHERZ, C., KARL, A., RAAKE, P., PFOSSER, A., BOEKSTEGERS, P., WELSCH, U., HIEMSTRA, P.S., VOGELMEIER, C., GALLO, R.L., CLAUSS, M., BALS, R. (2003) An angiogenic role for the human peptide antibiotic LL-37/hCAP-18. *J. Clin. Invest.* **111**(11), 1665-72.

- KOOK, A.I., YAKIR, Y., TRAININ, N. (1975) Isolation and partial chemical characterization of THF, a thymus hormone involved in immune maturation of lymphoid cells. *Cell. Immunol.* **19**, 151-7.
- KOZAK, M. (1998) Primer extension analysis of eukaryotic ribosome-mRNA complexes. *Nucleic Acids Res.* **26**(21), 4853-9.
- LARRICK, J.W., HIRATA, M., BALINT, R.F., LEE, J., ZHONG, J., WRIGHT, S.C. (1995) Human CAP18: a novel antimicrobial lipopolysaccharide-binding protein. *Infect. Immun.* **63**(4), 1291-7.
- LEGARE, C., GAUDREAU, C., ST-JACQUES, S., SULLIVAN, R. (1999) P34H sperm protein is preferentially expressed by the human corpus epididymidis. *Endocrinology* **140**(7), 3318-27.
- LEGARE, C., THABET, M., PICARD, S., SULLIVAN, R. (2001) Effect of vasectomy on P34H messenger ribonucleic acid expression along the human excurrent duct: a reflection on the function of the human epididymis. *Biol. Reprod.* **64**(2), 720-7.
- LEHMANN, J., RETZ, M., HARDER, J., KRAMS, M., KELLNER, U., HARTMANN, J., HOHGRAWE, K., RAFFENBERG, U., GERBER, M., LOCH, T., WEICHERT-JACOBSEN, K., STOCKLE, M. (2002) Expression of human beta-defensins 1 and 2 in kidneys with chronic bacterial infection. *BMC Infect. Dis.* **2**(1), 20.
- LEHRER, R.I., GANZ, T. (2002a) Defensins of vertebrate animals. *Curr. Opin. Immunol.* **14**(1), 96-102.
- LEHRER, R.I., GANZ, T. (2002b). Cathelicidins: a family of endogenous antimicrobial peptides. *Curr. Opin. Hematol.* **9**(1), 18-22.
- LI, P., CHAN, H.C., HE, B., SO, S.C., CHUNG, Y.W., SHANG, Q., ZHANG, Y.D., ZHANG, Y.L. (2001) An antimicrobial peptide gene found in the male reproductive system of rats. *Science* **291**(5509), 1783-5.
- LIEBHABER S.A., CASH F.E., SHAKIN S.H. (1984) Translationally associated helix-destabilizing activity in rabbit reticulocyte lysate. *J. Biol. Chem.* **259**(24), 15597-602.
- LILJA, H., LUNDWALL, A. (1992) Molecular cloning of epididymal and seminal vesicular transcripts encoding a semenogelin-related protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**(10), 4559-63.
- LILLARD, J.W. JR., BOYAKA, P.N., CHERTOV, O., OPPENHEIM, J.J., MCGHEE, J.R. (1999) Mechanisms for induction of acquired host immunity by neutrophil peptide defensins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**(2), 651-6.
- MALM, J., SORENSEN, O., PERSSON, T., FROHM-NILSSON, M., JOHANSSON, B., BJARTELL, A., LILJA, H., STAHL-BACKDAHL, M., BORREGAARD, N., EGESTEN, A. (2000) The human cationic antimicrobial protein (hCAP-18) is expressed in the epithelium of human epididymis, is present in seminal plasma at high concentrations, and is attached to spermatozoa. *Infect. Immun.* **68**(7), 4297-302.

- MARSHALL, S.H., ARENAS, G. (2003) Antimicrobial peptides: A natural alternative to chemical antibiotics and a potential for applied biotechnology. *Electronic Journal of Biotechnology [online]*. 15.08.2003 Ausgabe 6 Nummer 2. Abrufbar unter: <http://www.ejbiotechnology.info/content/vol6/issue3/full/1/bip/>. ISSN 0717-3458.
- MERRIFIELD, B. (1986) Solid phase synthesis. *Science* **232**, 341-7.
- MINTZ, K.P., MANN, K.G. (1990) Detection of procollagen biosynthesis using peptide-specific antibodies. *Matrix* **10**(3), 186-99.
- MÖRITZ, A., LILJA, H., FINK, E. (1991) Molecular cloning and sequence analysis of the cDNA encoding the human acrosin-trypsin inhibitor (HUSI-II). *FEBS Lett.* **278**(1), 127-30.
- NAGY, G., SZEKERES, G., KVELL, K., BERKI, T., NEMETH, P. (2002) Development and characterisation of a monoclonal antibody family against aquaporin 1 (AQP1) and aquaporin 4 (AQP4). *Pathol. Oncol. Res.* **8**(2), 115-24.
- NISHIMURA, A., MORITA, M., NISHIMURA, Y., SUGINO, Y. (1990) A rapid and highly efficient method for preparation of competent Escherichia coli cells. *Nucleic Acids Res.* **18**, 6169.
- NIZET, V., GALLO, R.L. (2003) Cathelicidins and innate defense against invasive bacterial infection. *Scand. J. Infect. Dis.* **35**(9), 670-6.
- OPPENHEIM, F.G., XU, T., MCMILLIAN, F.M., LEVITZ, S.M., DIAMOND, R.D., OFFNER, G.D., TROXLER, R.F. (1988) Histatins, a novel family of histidine-rich proteins in human parotid secretion. Isolation, characterization, primary structure, and fungistatic effects on Candida albicans. *J. Biol. Chem.* **263**(16), 7472-7.
- OSTERHOFF, C., KIRCHHOFF, C., KRULL, N., IVELL, R. (1994) Molecular cloning and characterization of a novel human sperm antigen (HE2) specifically expressed in the proximal epididymis. *Biol. Reprod.* **50**(3), 516-25.
- OZYORUK, F., CHEEVERS, W.P., HULLINGER, G.A., MCGUIRE, T.C., HUTTON, M., KNOWLES, D.P. (2001) Monoclonal antibodies to conformational epitopes of the surface glycoprotein of caprine arthritis-encephalitis virus: potential application to competitive-inhibition enzyme-linked immunosorbent assay for detecting antibodies in goat sera. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **8**(1), 44-51.
- PACOR, S., GIANGASPERO, A., BACAC, M., SAVA, G., TOSSI, A. (2002) Analysis of the cytotoxicity of synthetic antimicrobial peptides on mouse leucocytes: implications for systemic use. *J. Antimicrob. Chemother.* **50**(3), 339-48.
- PERI, A., FANTONI, G., GRANCHI, S., VANNELLI, G.B., BARNI, T., AMERINI, S., PUPILLI, C., BARBAGLI, G., FORTI, G., SERIO, M., MAGGI, M. (1997) Gene expression of endothelin-1, endothelin-converting enzyme-1, and endothelin receptors in human epididymis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **82**(11), 3797-806.
- PERRY, A.C., JONES, R., MOISYADI, S., COADWELL, J., HALL, L. (1999) The novel epididymal secretory protein ESP13.2 in *Macaca fascicularis*. *Biol. Reprod.* **61**(4), 965-72.

- PESCHEL, A. (2002) How do bacteria resist human antimicrobial peptides? *Trends Microbiol.* **10**(4), 179-86.
- QUAYLE, A.J., PORTER, E.M., NUSSBAUM, A.A., WANG, Y.M., BRABEC, C., YIP, K.P., MOK, S.C. (1998) Gene expression, immunolocalization, and secretion of human defensin-5 in human female reproductive tract. *Am. J. Pathol.* **152**(5), 1247-58.
- RAMBUKKANA, A., DAS, P.K., BURGGRAAF, J.D., FABER, W.R., TEELING, P., KRIEG, S., THOLE, J.E., HARBOE, M. (1992) Identification and characterization of epitopes shared between the mycobacterial 65-kilodalton heat shock protein and the actively secreted antigen 85 complex: their in situ expression on the cell wall surface of *Mycobacterium leprae*. *Infect. Immun.* **60**(11), 4517-27.
- RAO, C.D., PECH, M., ROBBINS, K.C., AARONSON, S.A. (1988) The 5' untranslated sequence of the c-sis/platelet-derived growth factor 2 transcript is a potent translational inhibitor. *Mol. Cell Biol.* **8**(1), 284-92.
- RAO, J., HERR, J.C., REDDI, P.P., WOLKOWICZ, M.J., BUSH, L.A., SHERMAN, N.E., BLACK, M., FLICKINGER, C.J. (2003) Cloning and characterization of a novel sperm-associated isoantigen (e-3) with defensin- and lectin-like motifs expressed in rat epididymis. *Biol. Reprod.* **68**, 290-301.
- RITTENHOUSE, J., MARCUS, F. (1984) Peptide mapping by polyacrylamide gel electrophoresis after cleavage at aspartyl-prolyl peptide bonds in sodium dodecyl sulfate-containing buffers. *Anal. Biochem.* **138**, 442-448.
- RODRIGUEZ-JIMENEZ, F.J. (2003) Identification and characterization of three new human β -defensins: hBD23, hBD27, and hBD29. *Dissertation im Fachbereich Chemie der Universität Hannover*.
- SAIKI, R.K., SCHARF, S., FALOONA, F., MULLIS, K.B., HORN, G.T., ERLICH, H.A., ARNHEIM, N. (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**, 1350-4.
- SANGER, F., NICKLEN, S., COULSON, A. R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463-7.
- SAWA, T., KURAHASHI, K., OHARA, M., GROPPER, M.A., DOSHI, V., LARRICK, J.W., WIENER-KRONISH, J.P. (1998) Evaluation of antimicrobial and lipopolysaccharide-neutralizing effects of a synthetic CAP18 fragment against *Pseudomonas aeruginosa* in a mouse model. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**(12), 3269-75.
- SCHÄGGER, H., VON JAGOW, G. (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* **166**, 368-79.
- SCHIESSLER, H., ARNHOLD, M., OHLSSON, K., FRITZ, H. (1976) Inhibitors of acrosin and granulocyte proteinases from human genital tract secretions. *Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem.* **357**(9), 1251-60.

- SCHRADER, M., JURGENS, M., HESS, R., SCHULZ-KNAPPE, P., RAIDA, M., FORSSMANN, W.G. (1997) Matrix-assisted laser desorption/ionisation mass spectrometry guided purification of human guanylin from blood ultrafiltrate. *J. Chromatogr. A.* **776**(1), 139-45.
- SCOTT, F.L., HIRST, C.E., SUN, J., BIRD, C.H., BOTTOMLEY, S.P., BIRD, P.I. (1999) The intracellular serpin proteinase inhibitor 6 is expressed in monocytes and granulocytes and is a potent inhibitor of the azurophilic granule protease, cathepsin G. *Blood* **93**(6), 2089-97.
- SCOTT, M.G., DAVIDSON, D.J., GOLD, M.R., BOWDISH, D., HANCOCK, R.E. (2002) The human antimicrobial peptide LL-37 is a multifunctional modulator of innate immune responses. *J. Immunol.* **169**(7), 3883-91.
- SCOTT, M.G., VREUGDENHIL, A.C., BUURMAN, W.A., HANCOCK, R.E., GOLD, M.R. (2000) Cutting edge: cationic antimicrobial peptides block the binding of lipopolysaccharide (LPS) to LPS binding protein. *J. Immunol.* **164**(2), 549-53.
- SHI, S.R., COTE, R.J., TAYLOR, C.R. (1997) Antigen retrieval immunohistochemistry: past, present, and future. *J. Histochem. Cytochem.* **45**(3), 327-43.
- SIMMACO, M., MIGNOGNA, G., BARRA, D., BOSSA, F. (1994) Antimicrobial peptides from skin secretions of *Rana esculenta*. Molecular cloning of cDNAs encoding esculentin and brevinins and isolation of new active peptides. *J. Biol. Chem.* **269**(16), 11956-61.
- SIMONOVIC, I., PATSTON, P.A. (2000) The native metastable fold of C1-inhibitor is stabilized by disulfide bonds. *Biochim. Biophys. Acta* **1481**(1), 97-102.
- SINGH, P.K., JIA, H.P., WILES, K., HESSELBERTH, J., LIU, L., CONWAY, B.A., GREENBERG, E.P., VALORE, E.V., WELSH, M.J., GANZ, T., TACK, B.F., MCCRAY, P.B. Jr. (1999) Production of beta-defensins by human airway epithelia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**(5), 2569.
- SKERLAVAJ, B., GENNARO, R., BAGELLA, L., MERLUZZI, L., RISSO, A., ZANETTI, M. (1996) Biological characterization of two novel cathelicidin-derived peptides and identification of structural requirements for their antimicrobial and cell lytic activities. *J. Biol. Chem.* **271**(45), 28375-81.
- SOBOTTA, J. (1988) Brust, Bauch, Becken, untere Extremität, in: J. STAUBESAND (Ed.), *Sobotta/Atlas der Anatomie des Menschen, Bd. 2, Urban & Schwarzenberg, München*, S. 227.
- SØRENSEN, O.E., FOLLIN, P., JOHNSEN, A.H., CALAFAT, J., TJABRINGA, G.S., HIEMSTRA, P.S., BORREGAARD, N. (2001) Human cathelicidin, hCAP-18, is processed to the antimicrobial peptide LL-37 by extracellular cleavage with proteinase 3. *Blood* **97**, 3951-9.
- SPECKNER, A., KROPFF, B., KNOR, S., MACH, M. (2000) The antigenic domain 1 of human cytomegalovirus glycoprotein B contains an intramolecular disulphide bond. *J. Gen. Virol.* **81**(11), 2659-63.
- STRYER, L. (1994) Biochemie. 2. Auflage, *Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg*.
- SUCHANKOVA, A., RITTEROVA, L., KRČMAR, M., KRČNAK, V., VAGNER, J., JOCHMUS, I., GISSMANN, L., KANKA, J., VONKA, V. (1991) Comparison of ELISA and western blotting for human papillomavirus type 16 E7 antibody determination. *J. Gen. Virol.* **72** (10), 2577-81.

- TANG, Y.Q., YUAN, J., OSAPAY, G., OSAPAY, K., TRAN, D., MILLER, C.J., OUELLETTE, A.J., SELSTED, M.E. (1999) A cyclic antimicrobial peptide produced in primate leukocytes by the ligation of two truncated alpha-defensins. *Science* **286**, 498-502.
- Taweethavonsawat, P., Chaicumpa, W., Chaisri, U., Chuenbal, U., Sakolvaree, Y., Tapchaisri, P., Wongsaroj, T. (2002) Specific monoclonal antibodies to *Strongyloides stercoralis*: a potential diagnostic reagent for strongyloidiasis. *Asian Pac. J. Allergy Immunol.* **20**(4), 247-56.
- Territo, M.C., Ganz, T., Selsted, M.E., Lehrer, R. (1989) Monocyte-chemotactic activity of defensins from human neutrophils. *J. Clin. Invest.* **84**(6), 2017-20.
- Thompson, D., Van Oosbree, T. (1992) TNTTM Lysate coupled transcription/translation: Comparison of the T3, T7 and SP6 Systems. *Promega Notes Magazine* **38**, 13.
- Tossi, A. (2003) Antimicrobial Sequences Database (AMSDb), abrufbar unter <http://www.bbcm.univ.trieste.it/~tossi/pag1.htm>.
- TRAN, D., TRAN, P.A., TANG, Y.-Q., YUAN, J., COLE, T., SELSTED, M.E. (2002) Homodimeric θ -Defensins from *Rhesus macaque* Leukocytes. *J. Biol. Chem.* **277**, 3079-84.
- Ulvssback, M., Lazure, C., Lilja, H., Spurr, N.K., Rao, V.V., Löffler, C., Hansmann, I., Lundwall, A. (1992) Gene structure of semenogelin I and II. The predominant proteins in human semen are encoded by two homologous genes on chromosome 20. *J. Biol. Chem.* **267**(25), 18080-4.
- Valore, E.V., Park, C.H., Quayle, A.J., Wiles, K.R., McCray, P.B. Jr., Ganz, T. (1998) Human beta-defensin-1: an antimicrobial peptide of urogenital tissues. *J. Clin. Invest.* **101**(8), 1633-42.
- Van Wetering, S., Sterk, P.J., Rabe, K.F., Hiemstra, P.S. (1999) Defensins: key players or bystanders in infection, injury, and repair in the lung? *J. Allergy Clin. Immunol.* **104**(6), 1131-8.
- Vizioli, J., Bulet, P., Hoffmann, J.A., Kafatos, F.C., Muller, H.M., Dimopoulos, G. (2001) Gambicin: a novel immune responsive antimicrobial peptide from the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**(22), 12630-5.
- Vogelstein, B., Gillespie, D. (1979) Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 615-19.
- Von Horsten, H.H., Derr, P., Kirchhoff, C. (2002) Novel antimicrobial peptide of human epididymal duct origin. *Biol. Reprod.* **67**, 804-13.
- Wan, X.S., Koch, C.J., Lord, E.M., Manzone, H., Billings, P.C., Donahue, J.J., Odell, C.S., Miller, J.H., Schmidt, N.A., Kennedy, A.R. (1995) Monoclonal antibodies differentially reactive with native and reductively modified Bowman-Birk protease inhibitor. *J. Immunol. Methods* **180**(1), 117-30.
- Weidemeyer, W.J., Welker, E., Narayan, M., Scheraga, H.A. (2000) Disulfide bonds and protein folding. *Biochemistry* **39**(23), 7032.

- WU, Z., HOOVER, D.M., YANG, D., BOULEGUE, C., SANTAMARIA, F., OPPENHEIM, J.J., LUBKOWSKI, J., LU, W. (2003) Engineering disulfide bridges to dissect antimicrobial and chemotactic activities of human beta-defensin 3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**(15), 8880-5.
- YAMAGUCHI, Y., NAGASE, T., MAKITA, R., FUKUHARA, S., TOMITA, T., TOMINAGA, T., KURIHARA, H., OUCHI, Y. (2002) Identification of multiple novel epididymis-specific beta-defensin isoforms in humans and mice. *J. Immunol.* **169**, 2516-23.
- YANAGIMACHI, R. (1994) Fertility of mammalian spermatozoa: its development and relativity. *Zygote* **2**, 371-2.
- YANG, D., CHERTOV, O., BYKOVSKAIA, S.N., CHEN, Q., BUFFO, M.J., SHOGAN, J., ANDERSON, M., SCHRÖDER, J.M., WANG, J.M., HOWARD, O.M., OPPENHEIM, J.J. (1999) Beta-defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6. *Science* **286**, 525-8.
- YELTON, D.E., SCHARFF, M.D. (1980) Monoclonal antibodies. *Am. Sci.* **68**(5), 510-6.
- YENUGU, S., HAMIL, K.G., BIRSE, C.E., RUBEN, S.M., FRENCH, F.S., HALL, S.H. (2003) Antibacterial properties of the sperm-binding proteins and peptides of human epididymis 2 (HE2) family; salt sensitivity, structural dependence and their interaction with outer and cytoplasmic membranes of Escherichia coli. *Biochem. J.* **372**(2), 473-83.
- YEUNG, C.H., COOPER, T.G., OBERPENNING, F., SCHULZE, H., NIESCHLAG, E. (1993) Changes in movement characteristics of human spermatozoa along the length of the epididymis. *Biol. Reprod.* **49**, 274-80.
- ZANETTI, M., GENNARO, R., ROMEO, D. (1995) Cathelicidins: a novel protein family with a common proregion and a variable C-terminal antimicrobial domain. *FEBS Lett.* **374**(1), 1-5.
- ZAREMBER, K.A., KATZ, S.S., TACK, B.F., DOUKHAN, L., WEISS, J., ELSBACH, P. (2002) Host defense functions of proteolytically processed and parent (unprocessed) cathelicidins of rabbit granulocytes. *Infect. Immun.* **70**(2), 569-76.
- ZASLOFF, M. (1987) Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**(15), 5449-53.
- ZHOU, L., HUANG, Q., BEUERMAN, R.W., GRIGG, M.E., LI, S.F.Y., CHEW, F.T., ANG, L., STERN, M.E., TAN, D. (2003) Proteomic Analysis of Human Tears: Defensin Expression after Ocular Surface Surgery. *J. Proteome Res.* im Druck.

7 Anhang

Geräte und Apparaturen

Neben laborüblichen Standardgeräten wie Präzisionspipetten, Heizplatten, Magnetrührern u.ä. wurden folgende Geräte verwendet:

Laborgerät (Modell)	Hersteller
Agarose-Gelelektrophorese-Apparatur	Renner, Darmstadt
Analytik-Waage (AC 120 S)	Sartorius, Göttingen
Bildbearbeitung:	
- Kodak EDAS 290-Dokumentations-system mit Software Kodak 1D v.3.5.0	Kodak, Frankfurt
- Gel Doc 2000 System mit Software QuantityOne® 4.0.1	Bio-Rad, California, USA
Inkubationsschrank (B6030)	Heraeus, Hanau
Kapillarelektrophorese-Sequencer:	
- ABI PRISM™ 310 Genetic Analyser	AppliedBiosystems, Weiterstadt
Kulturschüttler (Innova™ 4340)	New Brunswick, C.A., USA
Proteingelelektrophorese:	
- Mini-Protean II Elektrophoresezellen	BioRad, California, USA
- XCell Sure Lock Gelkammer	Invitrogen™, Groningen, NL
Speedvac Univapo (150 H)	Uniequip, Martinsried
Spektralphotometer (DU® 640)	Beckmann, München
Sterile Arbeitsbank (8511)	Köttermann, Uetze-Hänigsen
Thermocycler:	
- GeneAmp PCR System 2400 und 9600	Perkin Elmer, Weiterstadt
Ultraschallgerät (Vibra cell)	Sonic & Materials, Danbury, Connecticut, USA

Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Für allgemeine Laborarbeiten (Reaktionsgefäße, Handschuhe, Pipettenspitzen, Glaswaren usw.) waren die Firmen Greiner (Nürnberg), Eppendorf (Hamburg), Nunc (Wiesbaden) und Roth (Karlsruhe) die Bezugsquellen. Labor-Chemikalien wurden in Analysen-Qualität und biochemische Reagenzien in Molekularbiologie-Qualität von den Firmen Applichem (Darmstadt), Bio-Rad (California, USA), Boehringer (Mannheim), Life Technologies™ (Eggenstein), Merck (Darmstadt), Roche (Mannheim), Roth (Karlsruhe), Sigma-Aldrich (Deisenhofen), Peribo (Bonn) und Pharmacia (Freiburg) bezogen.

Filterpapier	Schleicher und Schuell, Hannover
Filterkarton Whatman 3 MM	Roth, Karlsruhe
Mehrfachkulturschalen, 24-Loch	Corning Costar, NY, USA
Mehrfachkulturschalen, 96-Loch, weiß m.D., Klarb.	Corning Costar, NY, USA
Mehrfachkulturschalen, 96-Loch, schwarz m.D., Klarb.	Corning Costar, NY, USA
Polyscreen® PVDF Transfer Membran 0,45 µm	NEN® Life Science LTD., Boston, USA
Röntgenfilm, CL-XPosure™	Peribo Science, Illinois, USA
Röntgenfilmentwickler Rodinal B&W	Agfa-Gevaert, Leverkusen
Röntgenfilmfixierer Tetenal Superfix	Tetenal Photowerk, Norderstedt
Sterilfilter: Millex-GS	Millipore, Eschborn

Danksagung

Ich danke dem wissenschaftlichen Leiter der IPF PharmaCeuticals GmbH (bis 31.03.2000: Niedersächsisches Institut für Peptid-Forschung GmbH), Herrn Prof. Dr. Dr. Wolf-Georg Forssmann, ganz herzlich für die Überlassung des interessanten Themas und die Bereitstellung der Möglichkeit zur Anfertigung dieser Arbeit in seinem Institut.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Erik Maronde für die stets engagierte, kompetente und freundschaftliche Betreuung während der Erstellung dieser Arbeit sowie für die Übernahme des Korreferates.

Herrn Prof. Dr. Walter Müller vom Zentrum Biochemie der Medizinischen Hochschule Hannover möchte ich für die Übernahme des Referates danken.

Bei Frau Dr. Aleksandra Heitland und Kolleginnen möchte ich mich für die Mühe bei der Herstellung der hBD17-Antikörper bedanken. Außerdem danke ich Herrn Prof. Dr. Christian Stief und Herrn Dr. Stefan Ückert von der urologischen Abteilung der MHH für die Bereitstellung verschiedener Gewebeproben.

Des weiteren danke ich Herrn Dr. Dirk Motzkus für die zahlreichen Diskussionen, Ideen und Hilfestellungen, die den Verlauf meiner Arbeit oft maßgeblich beeinflusst haben.

Ich möchte mich bei allen Mitarbeitern der IPF PharmaCeuticals GmbH und besonders bei der Defensingruppe für die gute Zusammenarbeit und das angenehme Arbeitsklima bedanken. Außerdem danke ich allen Kollegen der Abteilung Peptidsynthese für die Bereitstellung der hier beschriebenen synthetischen Peptide, sowie für die geduldige Beantwortung so mancher „kurzer Fragen“.

Frau Valeska Stadie danke ich für die tatkräftige Unterstützung in der praktischen Arbeit und auch sonst für alles...

Für das fleißige Korrekturlesen und/oder "seelische Unterstützung" danke ich Michaela, Katrin, Motzi, Annette, Sandra, Fränk, Sternchen, Moshing & Ickl, Tobi & Anja und Sebbe.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Martin Jübner

Geburtsdatum / -ort: 12.09.1967 in Diepholz

Staatsangehörigkeit: deutsch

Familienstand: geschieden

Schulische Ausbildung

1974 - 1978 Grundschohle in Barver

1978 - 1980 Orientierungsstufe Wagenfeld

1980 - 1984 Realschule in Wagenfeld

1984 - 1988 Gymnasium in Sulingen

Schulabschluß Abitur

Berufsausbildung:

1988 - 1991 Ausbildung zum Verwaltungsfachangestellten beim Landkreis Diepholz

Hochschulstudium:

1991 - 2000 Studium der Biologie an der Universität Hannover

Berufliche Tätigkeiten:

10/2000 - 02/2002 Wissenschaftlicher Mitarbeiter (Doktorand) im Rahmen des DFG-Graduiertenkollegs "Charakterisierung von regulatorischen Peptiden und ihrer Zielproteine" bei der IPF PharmaCeuticals GmbH, Hannover

03/2002 - voraussichtl. 05/2004 Wissenschaftlicher Mitarbeiter (Doktorand) der IPF PharmaCeuticals GmbH, Hannover

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, daß die vorliegende Dissertation von mir selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt wurde. Zu Hilfsleistungen herangezogene Institutionen und Personen habe ich vollständig angegeben. Ich versichere ferner, daß die Dissertation nicht schon als Diplomarbeit oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet worden ist.

Hannover, im April 2004

Martin Jübner